

**Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular**

**Estudio de los factores implicados en la  
barrera para las horquillas de replicación  
RFB1 presente en los genes del rRNA de  
*Schizosaccharomyces pombe***

Memoria presentada por Eva María Mejía Ramírez de Arellano para optar al  
grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid

El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), bajo la dirección del Dr. Pablo Hernández Valenzuela con la financiación del programa de Formación Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2004-00125, SAF2001-1740)

Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular  
Madrid, Septiembre de 2006



MINISTERIO  
DE EDUCACIÓN  
Y CIENCIA



CONSEJO SUPERIOR  
DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS  
CENTRO DE  
INVESTIGACIONES  
BIOLÓGICAS

## INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

La presente Tesis Doctoral ha sido dirigida por mí y realizada por la doctoranda Eva María Mejía Ramírez de Arellano en el Departamento de Biología Celular y del Desarrollo del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

El trabajo ha consistido en el estudio de la replicación del rDNA de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* y, más concretamente, en el análisis de la barrera para la replicación RFB1. Se ha purificado una proteína de unión específica a la secuencia de DNA correspondiente a RFB1. Esta proteína ha sido identificada como la proteína Sap1, la cual es esencial y necesaria también para un cambio eficiente del tipo de apareamiento en esta levadura. Sap1p ha sido expresada en bacterias y se ha sido generado un anticuerpo que reconoce la proteína tanto en *westerns* como *in situ*. Se han estudiado los requerimientos de secuencia de RFB1 para el bloqueo de las horquillas de replicación, que han resultado coincidir con los requerimientos para la unión Sap1p-RFB1. Esto, junto con la observación de que estirpes mutantes *sap1<sup>ts</sup>* muestran una RFB1 menos eficiente, demuestra que Sap1 es requerida para la función de la barrera natural RFB1 del rDNA de *S. pombe*. Parte de estos resultados han sido publicados recientemente (Mejía-Ramírez et al., Mol. Cell. Biol. 25: 8755-8761, 2005)

El rendimiento de Eva María Mejía Ramírez de Arellano ha sido altamente positivo. Los objetivos planteados se han alcanzado satisfactoriamente y suponen una aportación relevante en este campo de trabajo.

Madrid, a 1 de septiembre de 2006

Fdo.: Pablo Hernández Valenzuela  
DNI: 02502229J

"En un lugar de la Mancha, de cuyo nombre ..." sí quiero acordarme, porque allí nací, y allí comenzó mi camino. La Mancha, que no se caracteriza ni por sus verdes paisajes ni por su mar, sino por todo lo contrario. Sin embargo, es la tierra a la que tengo que agradecer la vida. Su aire, a veces, difícil de respirar pero de gran pureza. Su sol, ardiente como pocos, pero de una belleza inconmensurable en sus anocheceres en la llanura. Y, sobre todo, a sus gentes, abiertas, sinceras, que me han proporcionado la semilla de lo que quiero ser. Por eso, quiero escribir lo que ha sido mi viaje, desde el comienzo en la tierra del Quijote hasta estos días que vivo.

Es un viaje en el que no he estado sola. He tenido, tengo y tendré muchos compañeros de viaje, más cercanos, más lejanos, pero compañeros.

Los primeros han sido mi familia, y aquí siguen, conmigo, a donde quiera que vaya. Mi padre, Manuel, y mi madre, Dolores, que han dado todo su esfuerzo por nosotros, mis hermanos y yo, para que nuestra vida fuera como nosotros soñáramos. Vosotros sí habéis llegado lejos. Mi hermana, mi "Tati", para mí, ejemplo de paciencia, responsabilidad y coraje en la vida y en el trabajo, te quiero mucho. Mi hermano, Manuel, al que miro con admiración cada día y al que quiero desde que me cogió en brazos a mis tres días. A Pedro, mi cuñado, siempre pendiente de mi sonrisa. A mis sobrinos, Elena y Alejandro, qué pacientes habéis sido esperando a que terminara de estudiar para jugar con vosotros!

En mi viaje siempre ha estado presente la música, siempre he llevado mi guitarra auestas y he compartido canciones, alegrías y tristezas con la gente de mi coro de Santiago. Natalia, gracias por enseñarme la valentía, y por subir a este tren a Jose y a Lucia. Carmen, Rosita, Chelo, Libertad, Pilar...tantos momentos, gracias por estar ahí a pesar de la distancia. También la música me acercó a Isidoro, qué gran amigo eres! Y Bea, cuántas risas y lágrimas compartidas, y sigues a mi lado!

Y mi viaje me alejó de mi tierra querida, y me llevó a mi tierra adoptiva: Madrid. A ella le he de agradecer el haberme enseñado a vivir fuera de mi nido. Y para ello me dio a conocer a mis compañeros de viaje en la Universidad. Merche, mi hermana adoptiva, he compartido media vida contigo y la seguiría compartiendo, te mereces todo lo mejor. Charito, gracias por ser como un árbol fuerte al que agarrarse y al que poder abrazar para recobrar la energía. Eva, gracias por mostrarme tu coraje en tu trabajo y tu amistad a lo largo de los años. Silvia, gracias por tu sonrisa y por preocuparte siempre por mí. Fernando, Sergio y Nacho...sin vosotros, las cenas en casa no serían lo mismo! Javi Puente, gracias por ser el mejor compañero de clase y amigo.

Pero Madrid también acogió a más personas que decidieron seguir el viaje en el mismo tren que yo. María y Susana, hace ya diez años que nos conocimos y seguimos siendo amigas, como el primer día, gracias. Asun, gracias por cuidar de mí como una hermana mayor.

Y mi viaje continuó, pero por la ciencia. Gracias, Ricardo, Irma y Jose Luis por enseñarme las grandezas de las cosas pequeñas y por demostrarme cuán cerca puede



estar Marte. Gracias Eva L., tu fuiste la primera en enseñarme a coger una pipeta. Gracias, Javi Chichón, cuántos cafés y cuantas charlas, el primero de los doctores!

Y el tren me llevó al CIB. Gracias Pablo, director de esta tesis, me abriste la puerta al mundo de las levaduras. Gracias Bernardo y Débora por vuestros consejos en los experimentos.

Y los que han viajado conmigo estos años, todos los días... Alicia, qué te puedo decir! Gracias por haberme devuelto la confianza en cada momento de flaqueza, por ser mi maestra siempre. Raúl, gracias por ser ejemplo de tesón y fortaleza, no dejes nunca la ciencia. Ana, la dulzura y la sensatez personificadas, te echo mucho de menos. Rosa, no sabes cuanto admiro tu fuerza y tu sinceridad, no cambies. Leti, echo de menos tu dulzura. Leonor, hemos estado juntas mucho tiempo, y lo que más te agradezco es tu sonrisa sincera, nunca, nunca dejes de sonreír. MariaJo, gracias por darme tu apoyo en los momentos difíciles, sigue siempre adelante, vales mucho. Loli, la galeguiña, gracias por tu ánimo. Marta, gracias por hacerme ver cuán fuerte puedo llegar a ser. Marisa y Pilar, gracias por estar siempre pendientes de mí. María y Patricia, vosotras valéis mucho!!! A más compañeros de camino en el CIB, Carlos, compañero de asiento en el viaje, sé que aunque yo quisiera llorar, tú querrás hacerme reír. Patty, te echo de menos. Donna, gracias por tu compañía en el viaje, Yoli, repartes alegría cuando sonríes. María, mi amiga, cuando más lo necesité y siempre. Luque, gracias por recordarme lo bueno que es reír. Rafa, gracias por tratarme como una más en tu laboratorio y por tu gran ayuda siempre. Y muchos más compañeros, Inés, Mónica y Carmen (las "Vidalitas") y vuestro vecino, Asier. Los "Corbí", Elena, Laurita, Tilman, Diego... Javi Gayarre y Fran, mi navarro y mi "andalú". Mariano, todavía te debo un café. Tatu, qué habría hecho sin tus consejos. Pilar Zaragoza y Mar, mil gracias. Fátima, Maria, Javier, Jesús, Jose, Irene, Bea, Ernesto, Ángel, M<sup>a</sup> Ángeles, Eva T., Patricia y Eva G. Sois tantos y tanto que agradecer...

Y un buen día crucé el gran charco y llegué al lejano Oeste. Allí conocí a la "mafia española" en San Diego y os llevaré en mi corazón siempre. JR, ya sabes que eres un gran amigo y mi hermano "postizo" que tuve que ir a conocer al otro lado del mundo.

I would like to say something about my "other lab". Thanks to Charly and Oli, you made me smile at the difficult moments and I've learned a lot with you. Thanks to Victoria, Santi, Steph and Jess, you have helped me a lot. Thanks to Paul for the opportunity of working in your group. And thanks to Li-Lin, Yoshi, Clair and all the MB105 at the Scripps.

Y cuando volví, había más compañeros de viaje esperando, Fran (Faro), Josemi, Cari y Lourdes... qué alegría haberos conocido y que sigáis conmigo!!!

A partir de aquí, continuaré buscando mi tren y mi destino. Sólo espero que todos vosotros queráis seguir siendo mis compañeros de viaje.

<b>ARS</b>	Secuencia de replicación autónoma.
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino.
<b>DAPI</b>	4,6-diamino-2-fenilindol
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico, se ha optado por usar la abreviatura anglosajona.
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetra-acético
<b>EMSA</b>	Ensayo del cambio de movilidad electroforética
<b>ETS</b>	Espaciador externo transcrito del rDNA.
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i>
<b>Imp</b>	<i>imprint</i> o huella en el <i>locus</i> del tipo de apareamiento en <i>S. pombe</i>
<b>ITS</b>	Espaciador interno transcrito del rDNA
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>KDa</b>	KiloDalton
<b>NTS</b>	Espaciador intergénico no transcrito del rDNA.
<b>MPS1</b>	<i>mat1 pause site I</i> en el <i>locus</i> del tipo de apareamiento en <i>S. pombe</i>
<b>OD</b>	Densidad óptica
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>RFB, RFP</b>	Barreras para las horquillas de replicación del rDNA
<b>rDNA</b>	DNA ribosómico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico, se ha optado por usar la abreviatura anglosajona
<b>RTS1</b>	Barrera localizada en el <i>locus</i> del cambio del tipo de apareamiento en <i>S. pombe</i>
<b>TBE</b>	Tris-Borato-EDTA
<b>SSC</b>	Solución salina de citrato de sodio

<b>SUMMARY</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1. BARRERAS PARA LAS HORQUILLAS DE REPLICACIÓN	4
1.1. BARRERAS CAUSADAS POR HÍBRIDOS RNA-DNA	4
1.2. PARADAS DEPENDIENTES DE TRANSCRIPCIÓN	5
1.3. PARADA CAUSADA POR COMPLEJOS DNA-PROTEÍNA	6
1.3.1. Terminación de la replicación en cromosomas bacterianos	6
1.3.2. Parada de la replicación en secuencias centroméricas de <i>S. cerevisiae</i>	7
1.3.3. Paradas provocadas por proteínas de unión a secuencias teloméricas	8
1.3.4. Barrera RTS1 en el locus del tipo de apareamiento en <i>S. pombe</i>	8
1.3.5. Barreras para la replicación en los genes rRNA	10
2. BARRERAS PARA LA REPLICACIÓN EN LOS GENES rRNA DE ORGANISMOS EUCARIOTAS	10
2.1. ORGANIZACIÓN DE LOS GENES rRNA	11
2.2. REPLICACIÓN DEL LOCUS DEL rDNA	12
2.3. BARRERAS PARA LA REPLICACIÓN DEL rDNA DE <i>S. cerevisiae</i>	13
2.4. BARRERAS PARA LA REPLICACIÓN DEL rDNA DE RATÓN	16
2.5. BARRERAS PARA LA REPLICACIÓN DEL rDNA DE <i>S. pombe</i>	17
<b>OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
1. MATERIALES	25
1.1. MATERIAL BIOLÓGICO	25
1.2. MEDIOS DE CULTIVO	25
1.3. REACTIVOS, ENZIMAS Y OLIGONUCLEÓTIDOS	26
2. MÉTODOS	28
2.1. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS	28
2.1.1. Plásmido para la expresión de Sap1p en <i>E. coli</i>	28

2.1.2. Plásmidos para el ensayo de las barreras para la replicación del rDNA en <i>S. pombe</i>	28
2.2. CONSTRUCCIÓN DE LA ESTIRPE sap1Δ40-GFP	30
2.3. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS	31
2.3.1. Transformación <i>E. coli</i>	31
2.3.2. Transformación <i>S. pombe</i>	31
2.4. EXTRACCIÓN DE DNA	31
2.4.1. Extracción de DNA de <i>E. coli</i>	31
2.4.2. Extracción de DNA de <i>S. pombe</i>	31
2.5. ANÁLISIS DE LOS INTERMEDIARIOS DE REPLICACIÓN MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN GELES DE AGAROSA	33
2.5.1. Transferencia, marcaje e hibridación del DNA separado en geles de agarosa	35
2.6. PREPARACIÓN DE PROTEÍNAS	36
2.6.1. Expresión de His <sub>6</sub> -Sap1p en <i>E. coli</i>	36
2.6.2. Extracción de proteínas totales de <i>E. coli</i>	36
2.6.3. Purificación de His <sub>6</sub> -Sap1p por afinidad en columna de Ni	36
2.6.4. Extracción de proteínas totales de <i>S. pombe</i>	36
2.6.5. Purificación de Sap1p a partir de un extracto de proteínas totales de <i>S. pombe</i>	38
2.6.6. Generación de suero policlonal anti-Sap1p en conejo	39
2.7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	39
2.7.1. Ensayos del cambio de la movilidad electroforética (EMSA) para el análisis de la formación de complejos DNA-proteína	39
2.7.2. Separación electroforética de proteínas e inmunodetección	40
2.7.3. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas	41
2.8. ANÁLISIS DE CÉLULAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	41
2.9. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA EN <i>S. pombe</i>	42
2.9.1. Fijación en etanol al 70% y tinción con DAPI	42

2.9.2. Inmunicitoquímica en <i>S. pombe</i>	42
---	----

<b>RESULTADOS</b>	<b>44</b>
1. ESTUDIO DE LOS FACTORES DE UNIÓN A RFB1	45
1.1. OPTIMIZACIÓN DE LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO Rfb1p-DNA <i>IN VITRO</i> Y SU DISOCIACIÓN	47
1.2. PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA Rfb1p DE <i>S. pombe</i>	49
1.2.1. Sap1p: "Switch Activating Protein"	50
2. CONFIRMACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE Sap1p POR RFB1	51
3. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE UNIÓN DE Sap1p	53
4. CORRELACION ENTRE LA UNIÓN DE Sap1p A RFB1 Y EL BLOQUEO DE LAS HORQUILLAS DE REPLICACIÓN	54
4.1. ESTUDIO DE DELECCIONES SOLAPANTES MEDIANTE GELES BIDIMENSIONALES Y EMSA	54
4.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA MUTACIÓN DE CADA REPETICIÓN DE RFB1	57
5. ANÁLISIS DE LA REPLICACIÓN DE LAS SECUENCIAS SAS1 Y RFB1	61
6. ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN RFB1 EN ESTIRPES <i>swi1Δ</i> Y <i>swi3Δ</i>	63
7. ANÁLISIS DE MUTANTES TERMOSENSIBLES <i>sap1<sup>ts</sup></i>	64
7.1. ESTUDIO DEL FENOTIPO DE LAS ESTIRPES <i>sap1<sup>ts</sup></i>	65
7.1.1. Crecimiento	65
7.1.2. Tinción con DAPI y observación al microscopio de fluorescencia	66
7.1.3. Citometría de flujo de las estirpes <i>sap1<sup>ts</sup></i>	68
7.1.4. Estudio de la replicación del <i>locus</i> del rDNA en <i>sap1<sup>ts</sup></i>	69
8. LOCALIZACIÓN CELULAR DE Sap1p	71
9. EFECTO DE LA ELIMINACIÓN DE LOS 40 AMINOÁCIDOS DEL EXTREMO CARBOXILO DE Sap1p EN LA VIABILIDAD CELULAR	72

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>75</b>
1. Sap1p Y LAS BARRERAS PARA LA REPLICACIÓN EN EL rDNA	76
2. Sap1p Y SEGRACIÓN CROMOSÓMICA	80
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>84</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO</b>	<b>98</b>

## *SUMMARY*

*Schizosaccharomyces pombe* rRNA genes contain four replication fork barriers (RFB1-3 and RFP4) located in the nontranscribed spacer. RFB2 and RFB3 require binding of the transcription terminator factor Reb1p to two identical recognition sequences that colocalize with these barriers. RFB1 and RFP4 function in a Reb1p-independent manner, and cognate DNA-binding proteins for these barriers have not been identified yet. Here we functionally define RFB1, which is the strongest of the four barriers, within a 78-bp sequence located near the 3' end of the rRNA coding region. A protein that specifically binds to this sequence was purified by affinity chromatography and identified as Sap1p by mass spectrometry. Specific binding to RFB1 was confirmed by using Sap1p expressed in *Escherichia coli*. Sap1p is essential for viability and is required for efficient mating-type switching. Mutations in RFB1 that precluded formation of the Sap1p-RFB1 complex systematically abolished replication barrier function, indicating that Sap1p is required for replication fork blockage at RFB1.

Replication fork arrest induced by Sap1p at RFB1 is not the essential role of Sap1p, since survival of *swi1Δ* or *swi3Δ* mutant cells, lacking RFB1 activity, is not compromised.

The results obtained in the present thesis rise the possibility that the essential role of sap1p could be played in the nucleolus. Experiments to elucidate this possible new role of Sap1p at the rRNA genes are underway.



# *INTRODUCCIÓN*

## 1. BARRERAS PARA LAS HORQUILLAS DE REPLICACIÓN

La correcta replicación del DNA es un requisito exigido para que la segregación de los cromosomas se produzca con éxito antes de la división en células proliferativas. Sin embargo, el proceso de replicación puede verse afectado por causas externas o internas, que pueden provocar la parada de la horquilla y, eventualmente, el desensamblaje de la maquinaria de replicación. A este tipo de paradas se las denomina “paradas accidentales”, las cuales inducen el mecanismo de *checkpoint* replicativo y el de eliminación de las causas que provocaron la parada de la horquilla.

Actualmente se cree que una de las causas más importantes de inestabilidad genómica es, precisamente, la parada de la maquinaria replicativa. Resulta llamativo el hecho de que existen sitios específicos del genoma donde se produce la parada de la horquilla de replicación de un modo natural o programado. Este tipo de paradas parecen cumplir funciones específicas que serán descritas a continuación.

La parada natural de la horquilla de replicación puede deberse a distintas causas, que se incluyen en la Tabla1, al final de este apartado.

### 1.1. PARADA CAUSADA POR HÍBRIDOS RNA-DNA

En los orígenes de replicación del tipo ColE1, el mecanismo de iniciación de la replicación consiste en la formación de un híbrido RNA-DNA. En las formas multiméricas de plásmidos con este tipo de origen, sólo uno de ellos se activa por ronda replicativa, (Martín-Parras y col., 1992). En plásmidos diméricos con dos orígenes de replicación enfrentados, aquel que no es activado funciona como una potente barrera para el desplazamiento de la horquilla de replicación. La barrera es generada en el origen inactivo como consecuencia de que la helicasa replicativa, DnaB, es incapaz de deshacer el híbrido que se forma entre el cebador RNA y el DNA (Viguera y col., 1996; Santamaría y col., 1998).

## 1.2. PARADAS DEPENDIENTES DE TRANSCRIPCIÓN

En los genes tRNA de *S. cerevisiae* se han localizado paradas para la replicación de tipo polar (Desphande y col., 1996). En ausencia de transcripción en estos genes, estas paradas desaparecen, lo cual indica que son dependientes de transcripción. Es posible que el mecanismo por el cual la maquinaria replicativa tiene dificultades para su avance sea por la acumulación de superenrollamiento positivo en la zona situada entre las maquinarias de transcripción y replicación debida al avance en sentido opuesto de ambas (Olavarrieta y col., 2002).

En estudios realizados en sistemas virales se ha observado que las colisiones frontales entre la horquilla de replicación y el complejo ternario de transcripción RNAP son más desventajosas que las colisiones co-orientadas (Liu y col., 1993; Liu y Alberts 1995; Elías-Arnanz y Salas, 1997 y 1999). En la colisión frontal, la polimerasa del  $\phi 29$  es bloqueada por un complejo RNAP detenido y la replicación se reanuda una vez que se permite el movimiento de RNAP (Elías-Arnanz y Salas 1999). Esto sugiere que el complejo ternario de transcripción RNAP detenido supondría un impedimento físico para el avance de la horquilla de replicación.

En una estirpe de *S. cerevisiae* *FOB1Δ* y en la que el número de copias de genes rRNA se redujo de 150 a 20, con lo que la fracción de genes activos aumenta, se observó un enlentecimiento de la horquilla de replicación en estos genes, debido a la colisión entre transcripción y replicación (Takeuchi y col., 2003) y en un fondo *FOB1Δ*. Mediante geles bidimensionales se observó un enlentecimiento de la replicación debida a la colisión entre la transcripción y la replicación.

En esta misma levadura, Prado y Aguilera (2005) estudiando la recombinación dependiente de transcripción en un sistema plasmídico, observaron que, antes de la recombinación, se produce el encuentro de las maquinarias de replicación y de transcripción, lo que provoca la parada de la horquilla replicativa. Puesto que también observaron que la helicasa RRM3p promovió el avance de la horquilla en una parada dependiente de transcripción,

los autores sugieren que un complejo nucleoproteico dependiente de transcripción impide la replicación en sentido opuesto y que éste es eliminado por la actividad helicasa de RRM3p.

### 1.3. PARADA CAUSADA POR COMPLEJOS DNA-PROTEÍNA

Hasta el momento se ha descrito una serie de proteínas cuya unión a DNA provoca una parada parcial o total de la replicación. En este grupo están incluidas proteínas virales, procariotas y eucariotas. A continuación se detallan las más representativas.

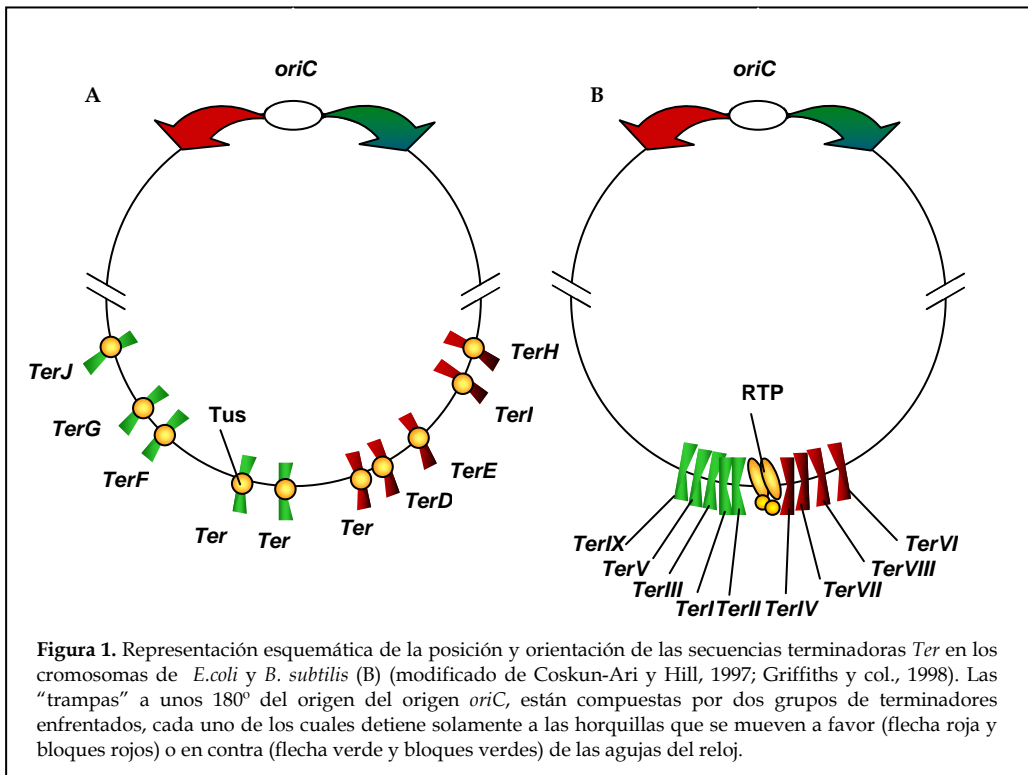
#### 1.3.1. Terminación de la replicación en cromosomas bacterianos

La terminación de la replicación del cromosoma bacteriano ha sido ampliamente estudiada en la bacteria *gram* negativa *E. coli* y en la *gram* positiva *Bacillus subtilis*. Ambas especies poseen en su cromosoma circular un único origen bidireccional de forma que durante la replicación hay dos horquillas de replicación que progresan en sentido opuesto. La terminación ocurre en una región a unos 180° del origen. Esta región está flanqueada en ambas especies por varias barreras de replicación que actúan de manera polar colocadas en dos grupos inversamente orientados. El resultado es una “trampa” para las horquillas de replicación, puesto que no tienen dificultades para entrar en la región, pero su salida está impedida por las barreras (Figura 1).

El mecanismo de terminación de la replicación en ambas especies es similar. En la región de las barreras existe una serie de secuencias denominadas *Ter* que son reconocidas por la proteína en el caso de *E. coli* (Hill y col., 1989 y 1992) o por dos dímeros de la proteína RTP en el caso de *B. subtilis*. (Carrigan y col., 1987).

La parada de la replicación en los sitios *Ter* de ambas bacterias se debe a la actividad anti-helicasa replicativa de los complejos *Ter*-Tus y *Ter*-RTP. Dicha actividad antihelicasa es polar, de modo que impide el paso de la horquilla de replicación en un sentido y no en el opuesto. Los complejos *Ter*-Tus y *Ter*-RTP también son capaces de inhibir la progresión de ciertas RNA

polimerasas con la misma polaridad con la que detienen la replicación (Mohanti y col., 1996 y 1998).



### 1.3.2. Parada de la replicación en secuencias centroméricas de *S. cerevisiae*

Las horquillas de replicación que se aproximan desde cualquier punto del cromosoma a los centrómeros de los cromosomas I, III y IV de *S. cerevisiae* sufren una parada relativamente breve (Greenfeder y Newlon, 1992). La capacidad de parar la replicación viene dada por la unión de las proteínas centroméricas al DNA, no existiendo secuencias específicas de parada. Sólo mutaciones puntuales en *CEN3*, que impiden la unión de las proteínas centroméricas, evitan la detención de la horquilla de replicación. También en este caso, la helicasa RRM3p parece facilitar el avance la horquilla desplazando a proteínas centroméricas unidas al DNA (Ivessa y col., 2003).

### 1.3.3. Paradas provocadas por proteínas de unión a secuencias teloméricas

Existen proteínas de unión a DNA que se encuentran unidas al telómero y que impiden el avance de la horquilla de replicación. De nuevo, en *S. cerevisiae*, la helicasa RRM3p facilita la replicación a través de estos complejos DNA-proteína (Ivessa y col., 2003)

En un estudio realizado por Miller y col. (2006) en *S. pombe* se observó que Taz1p, un regulador de diversas funciones teloméricas, es crucial para la progresión eficiente de la horquilla de replicación a través del telómero, puesto que su eliminación conduce a la parada de las horquillas en ellos.

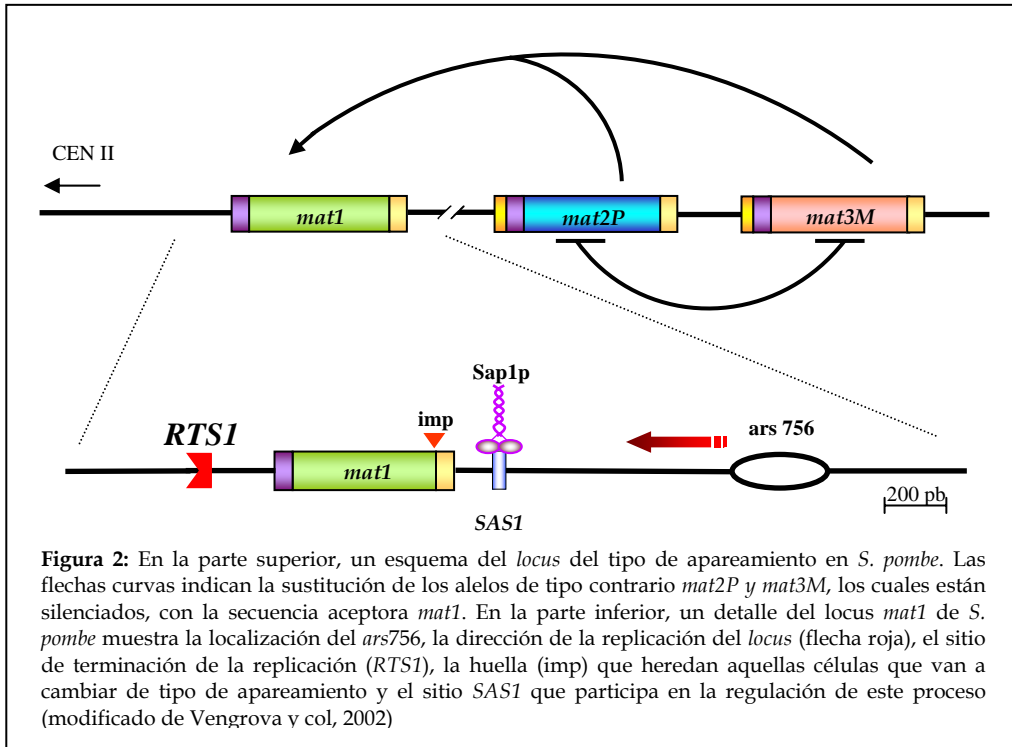
Ambos estudios indican que existen proteínas teloméricas que dificultan la progresión de la horquilla replicativa y que existen factores que lo promueven, como RRM3p en *S. cerevisiae* y Taz1p en *S. pombe*.

### 1.3.4. Barrera RTS1 en el locus del tipo de apareamiento en *S. pombe*

En las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe*, el cambio del tipo de apareamiento se debe a la alternancia en la expresión de los diferentes alelos del locus *MAT* o *mat1*, respectivamente, debida a un proceso de recombinación. Ambos loci se componen de tres genes, uno transcripcionalmente activo y dos silenciados y de tipo contrario, que actúan como donadores de las secuencias que finalmente se van a transcribir (Figura 2). En *S. pombe*, la naturaleza asimétrica del proceso replicativo juega un papel muy importante en el cambio de tipo de apareamiento, mediado por recombinación de las secuencias donadoras *mat2P* y *mat3M* con *mat1* (revisado en Dalgaard y Klar 2001).

Diversos experimentos genéticos han demostrado que el locus *mat1* está marcado por una “huella” que se genera en la hebra retrasada durante la síntesis del DNA (revisado en Vengrova y col., 2002). La naturaleza de esta huella se debate actualmente entre una modificación de DNA a RNA, que genera posteriormente una rotura de cadena doble (Vengrova y Dalgaard, 2004), o una rotura de cadena simple, que luego genera la rotura de cadena doble (Holmes y col., 2005). Dicha huella provoca una pausa (MPS1, Mating Pausing Site) de la

horquilla de replicación que avanza en dirección al centrómero (Dalgaard y Klar, 2000). Las proteínas Swi1 y Swi3 son necesarias para la parada en MPS1 pero se desconoce si éstas interaccionan directamente con el DNA en MPS1.



Para que se genere la huella, es estrictamente necesario que el locus sea replicado por horquillas que se muevan hacia el centrómero (Figura 2). Esto es asegurado por la presencia de un sitio polar de terminación de la replicación denominado *RTS1*, que impide que entren horquillas en la zona moviéndose hacia el centrómero (Dalgaard y Klar, 2001). La secuencia de esta señal de terminación está compuesta por cuatro repeticiones imperfectas a las que según Lee y col. (2004) se unen las proteínas Swi1p y Swi3p, necesarias para que se produzca la parada de la replicación. La proteína Rtf1p, que contiene dominios del tipo Myb de unión a DNA, podría ser necesaria para la función de *RTS1* por unión a las cuatro repeticiones que la componen (Codlin y Dalgaard, 2003).

RTS1 constituye la única barrera replicativa en la que se ha demostrado una función biológica específica en el desarrollo celular que, concretamente, es el cambio del tipo de apareamiento en *S. pombe*.

### 1.3.5. Barreras para la replicación en los genes rRNA

Este tipo de barreras son los terminadores de replicación en eucariotas que mejor se han caracterizado (revisado en López-Estraño y col., 1997). Todos los genes rRNA de organismos eucariotas estudiados hasta el momento contienen varias barreras para la replicación denominadas RFB (*Replication Fork Barriers*). Las barreras se encuentran agrupadas y localizadas en la zona espaciadora no transcrita (NTS, *Non Transcribed Spacer*) próximas al extremo 3' de la región codificante. Las RFBs del rDNA son polares de modo que detienen sólo aquellas horquillas que se mueven en sentido opuesto a la transcripción. Una de las funciones que se les atribuye a estas barreras es la de prevenir los posibles efectos deletéreos que la colisión entre las maquinarias de replicación y transcripción pudieran ocasionar (Kobayashi y col., 1998). También se ha propuesto que las RFBs podrían jugar un papel en la regulación del número de repeticiones en el *locus* (Defossez y col., 1999).

Hasta ahora se han caracterizado varias proteínas involucradas en las barreras del *locus* ribosómico por su unión al DNA, como por ejemplo Fob1p en *S. cerevisiae* (Kobayashi y Horiuchi, 1996), Reb1p en las barreras RFB2 y RFB3 en *S. pombe* (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004) y mTTF-1 en ratón (López-Estraño y col., 1998). A continuación se detalla la información de la que se dispone sobre estas barreras.

## 2. BARRERAS PARA LA REPLICACIÓN EN LOS GENES rRNA DE ORGANISMOS EUCARIOTAS

Los ribosomas son componentes celulares complejos de cuyo correcto funcionamiento depende la producción de proteínas en la célula. La biogénesis de los ribosomas depende de la síntesis coordinada de más de 85 proteínas y cuatro especies de RNA ribosómico (rRNA), de su correcto procesamiento y de

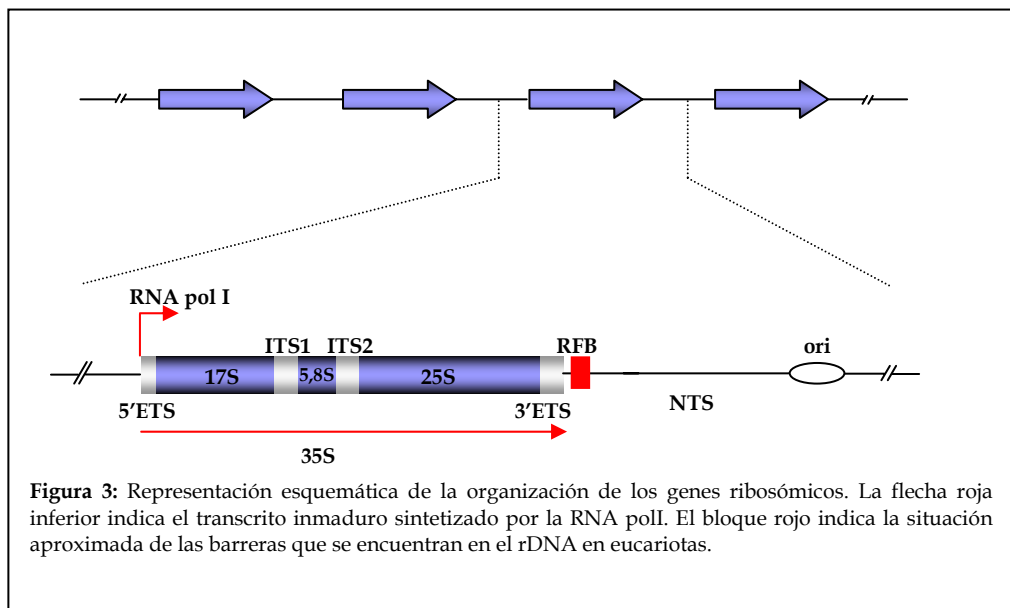


su ensamblaje en ribosomas funcionales. En la mayoría de las especies, los genes rRNA ocupan una fracción del genoma cuantitativamente importante, como por ejemplo, el 10% del DNA total de *S. cerevisiae*. Se trata de genes altamente activos, de modo que el rRNA constituye alrededor del 80% de todo el RNA en células de levaduras en proliferación (revisado en Warner, 1999).

El rDNA de los organismos eucariotas está muy conservado tanto en su organización como en sus características funcionales.

## 2.1. ORGANIZACIÓN DE LOS GENES rRNA

Los genes rRNA se organizan en un *locus* o varios *loci* como unidades repetidas en tándem de número variable según la especie. Cada repetición consta de una unidad transcripcional y de un espaciador intergénico no transcrito o NTS (Figura 3). En el NTS se localizan las señales de iniciación y terminación de la transcripción (Paule y White, 2000). Esta región presenta una gran variabilidad de secuencia y de tamaño, aún entre organismos evolutivamente próximos, a diferencia de la alta conservación que se observa en la secuencia de la región codificante (López-Estraño y col., 1997).



La enzima RNA polimerasa I (RNA pol I) transcribe el precursor del rRNA, que es procesado para dar lugar a tres de los diferentes rRNA maduros 17-18 S, 5,8 S y 25-28 S (Paule y White, 2000). Se denomina 5'-ETS y 3'-ETS (espaciadores externos transcritos) a los segmentos ubicados en ambos extremos de la unidad transcripcional, que son eliminados durante el procesamiento del rRNA primario, e ITS (espaciadores internos transcritos) a los que separan entre sí los tres rRNA maduros (Long y David, 1980). En la mayoría de los organismos eucariotas los genes que codifican para el rRNA 5 S, transcrito por la enzima RNA polimerasa III (RNA pol III), se localizan en *locus* o *loci* distinto(s) a los demás genes ribosómicos. Como excepción, en *S. cerevisiae* existe una copia 5S en el NTS de cada repetición del rDNA.

## 2.2. REPLICACIÓN DEL LOCUS DEL rDNA

Los genes que codifican para los rRNA son transcritos y replicados al mismo tiempo durante la fase S. El estudio de micrografías electrónicas del *locus* ribosómico demostró una coincidencia espacial y temporal de burbujas de replicación y complejos transcripcionales activos (revisado en López-Estraño y col., 1997). Dada la elevada procesividad de las polimerasas replicativas y transcripcionales, existe una alta probabilidad de que se produzca un encuentro entre ambas maquinarias en estos genes (revisado en Müller, 2000). Este encuentro de horquillas podría dificultar los procesos de transcripción y de replicación.

La replicación del rDNA se inicia preferentemente en el NTS. En *S. cerevisiae* ocurre en una región específica donde existe una secuencia de replicación autónoma (ARS) (revisado en Brewer y Fangman, 1988). Sin embargo, en eucariotas superiores la replicación se inicia de forma difusa a lo largo del NTS, aunque estudios recientes realizados en células humanas y de rata indican que existen dos sitios preferentes de iniciación en el rDNA de ambas especies, cuya localización dentro del NTS está conservada (Gencheva y col., 1996)

Como se comentó en el apartado anterior, una característica común de la replicación del rDNA en organismos eucariotas es la presencia de una o varias

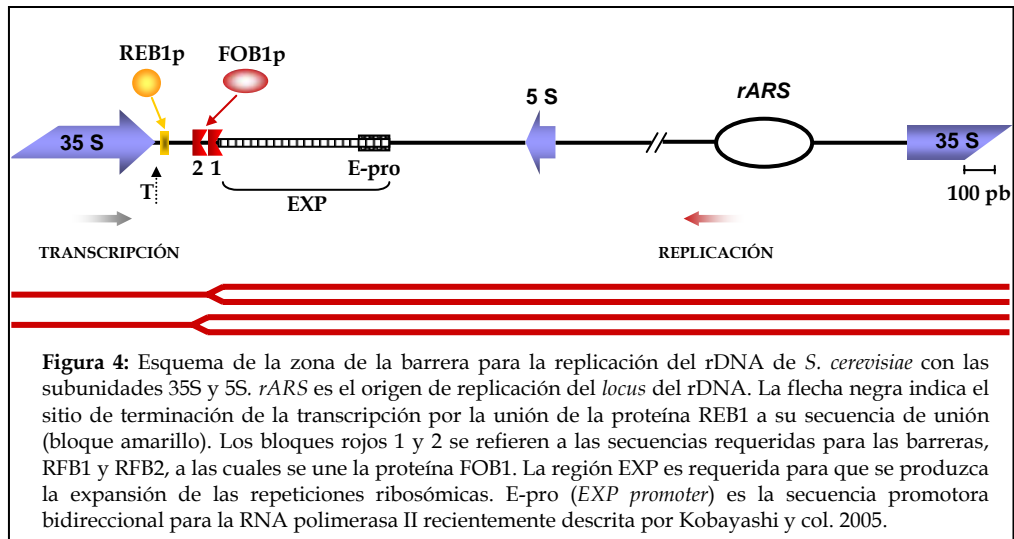
barreras replicativas (RFB) localizadas en el NTS, muy próximas entre sí, cerca del extremo 3' de la unidad transcripcional. Dichas barreras han sido descritas *in vivo* en levaduras de gemación y de fisión (Brewer y Fangman, 1988; Linskens y Huberman, 1988; Kobayashi y col. 1992; López-Estraño y col., 1997; Sánchez-Gorostiaga y col., 2004), en *Xenopus* (Wiesendanger y col., 1994), plantas (Hernández y col., 1993, López-Estraño y col., 1999) y mamíferos (Little y col., 1993; López-Estraño y col., 1998). Resulta interesante el hecho, comentado en el apartado anterior, de que estas barreras detienen solamente las horquillas de replicación que avanzan en contra de la transcripción. Como consecuencia, a pesar de que los orígenes de replicación en eucariotas son bidireccionales, en el caso concreto del rDNA, al quedar una de las dos horquillas bloqueadas por la barrera, la replicación del rDNA es prácticamente unidireccional, avanzando en el mismo sentido que la maquinaria de transcripción. Es posible que las barreras para la replicación en el rDNA tengan como función última evitar la colisión entre las maquinarias de transcripción y replicación evitando así sus posibles efectos deletéreos.

### **2.3. BARRERAS PARA LA REPLICACIÓN DEL rDNA DE *S. cerevisiae***

*S. cerevisiae* fue la primera especie en la que se identificó una RFB en el *locus* de los genes rRNA (Brewer y Fangman 1988, Linskens y Huberman, 1988). Las horquillas de replicación se detienen en el NTS cerca del extremo 3' de la unidad transcripcional. Este bloqueo tiene lugar independientemente de la transcripción del rDNA, ya que es activa en ausencia de actividad transcripcional, estudiado en mutantes para la subunidad RPA35 de la RNA polII, e introducida en un plásmido de replicación autónoma (Brewer y col., 1992; Kobayashi y col., 1992). Posteriormente, mediante el uso de la técnica de electroforesis bidimensional de alta resolución y estudios de mutagénesis, el grupo de B. Brewer comprobó que la RFB de *S. cerevisiae* estaba realmente constituida por dos sitios separados unos 40 pb, denominados RFB1 y RFB2, donde las horquillas que progresan en contra de la transcripción son bloqueadas (Ward y col., 2000).

Entre las dos barreras y el extremo 3' del gen 25S está localizado el sitio de unión del factor REB1p, un componente esencial para la terminación de la transcripción por la RNA pol I (Lang y Reeder, 1993) (Figura 4). Hasta el momento, las evidencias disponibles indican que ni REB1p ni su sitio de unión al rDNA son requeridos para la función de las RFB1s de esta levadura (Ward y col., 2000).

La proteína FOB1 es requerida para la parada de la replicación (Kobayashi y Horiuchi, 1996) en el rDNA de *S. cerevisiae*. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina y de microscopía de fuerza atómica se ha demostrado que FOB1p se une directamente a dos secuencias separadas en la región de la barrera (Kobayashi, 2003; Mohanty y Bastia, 2004). FOB1p contiene un dominio con posible estructura de “dedo de zinc” que sería esencial para la unión a las barreras, el bloqueo de la horquilla y la actividad recombinogénica en el rDNA (Kobayashi, 2003). *FOB1* fue identificado originalmente como un gen necesario para la actividad recombinogénica del elemento de rDNA *HOT1*. Dicho elemento estimula intercambios genéticos en regiones adyacentes cuando se inserta en un sitio distinto al rDNA (Keil y Roeder, 1984).



La helicasa RRM3p de *S. cerevisiae* es requerida para la progresión de las horquillas de replicación a través del rDNA. Su ausencia hace que la barrera provocada por la unión de FOB1p al rDNA aumente su intensidad (Ivessa y col., 2000; Krings y Bastia 2004). A lo largo de los últimos años, el grupo de Kobayashi ha obtenido una serie de evidencias que indican que la parada de las horquillas en las RFBs del rDNA de *S. cerevisiae* promueven, bajo determinadas condiciones experimentales, la recombinación en el *locus* ocasionando expansión o contracción del número de copias repetidas, así como la formación de círculos extracromosómicos (ERCs) que parecen ser causa del envejecimiento en esta levadura (Kobayashi y col., 1998, 2001; Takeuchi y col., 2003; Defossez y col., 1999).

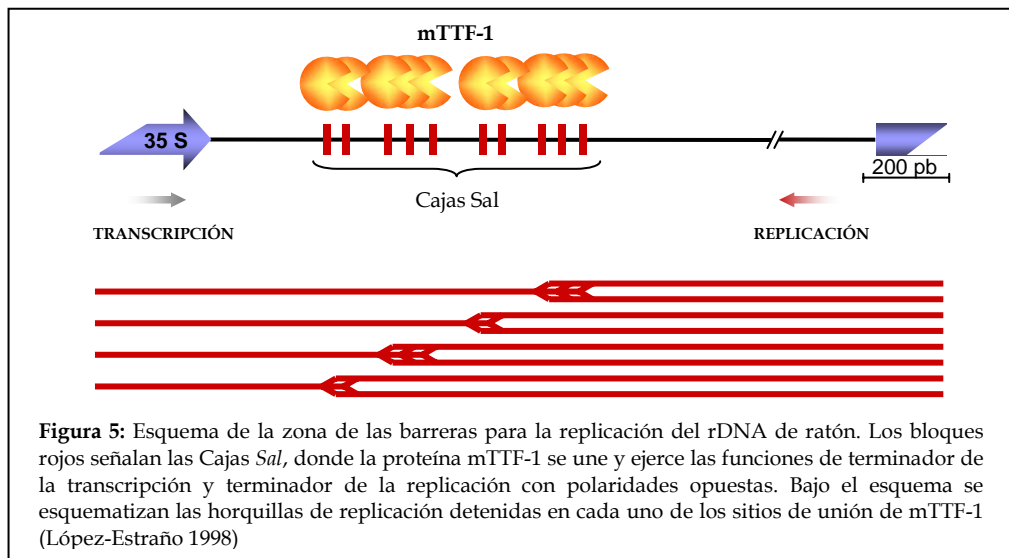
Recientemente, Kobayashi y Ganley (2005) han propuesto un modelo sobre la recombinación en el rDNA de *S. cerevisiae*. Se identificó una secuencia altamente conservada que funciona como un promotor bidireccional (E-pro) para la polimerasa RNA II dentro de la región denominada EXP del rDNA de *S. cerevisiae* (Kobayashi y col., 2001) (Figura 4). Este promotor no parece estar asociado con ninguna función codificante y su posición y conservación en levaduras sugería que podría jugar algún papel importante en el rDNA. En situaciones normales, la actividad silenciadora de SIR2 reprime la actividad de este promotor, de modo que no se altera la asociación de las cohesinas. En estas condiciones las roturas que puedan sufrir las horquillas detenidas en las RFB son reparadas mediante recombinación simétrica entre cromátidas hermanas, con lo que no se producen cambios en el número de copias repetidas del rDNA. Cuando se elimina el silenciamiento de SIR2, como por ejemplo en una estirpe *SIR2Δ*, el promotor bidireccional se activa y la transcripción desplaza a las cohesinas. En este caso, la reparación de las roturas de cadena doble en las barreras se puede reparar utilizando copias de rDNA que estén más lejanas, lo cual resulta en un intercambio asimétrico y en una variación del número de copias de los genes rRNA.

Por otra parte, la proteína FOB1 tiene una función no relacionada con las barreras dentro del rDNA. FOB1p es un regulador negativo dentro de la ruta

FEAR (*Cdc-Fourteen Early Anaphase Release*) inhibiendo la disociación del complejo Cdc14-Cfi1/Net1 necesaria para la iniciación de anafase (revisado en Stegmeier y Amon, 2004).

#### 2.4. BARRERAS PARA LA REPLICACIÓN DEL rDNA DE RATÓN

El rDNA de ratón está compuesto por unas 100 copias de unas 44 kb cada una, siendo el NTS de casi 31 kb (Figura 5). La terminación de la transcripción ocurre a unos 600 pb del extremo 3' del gen 28S y está mediada por el factor terminador mTTF-1 (*Murine Transcription Termination Factor*) homólogo a REB1p de *S. cerevisiae* (Grummt y col., 1985). Esta proteína se une a un elemento repetido de 18 pb denominado “caja Sal”, ya que contiene la diana de la enzima de restricción *Sal*I. Existen diez de estas “cajas Sal” organizadas en cuatro grupos que actúan como terminadores específicos de la transcripción por RNA pol I de forma polar, es decir, únicamente son activos en la orientación adecuada respecto al sentido de la transcripción (Grummt y col., 1985; Gerber y col., 1997; Kuhn y col., 1990).



El rDNA de ratón contiene una zona de barreras para la replicación que consiste en varios sitios de bloqueo de las horquillas, ubicados en la región de las “cajas Sal”. El análisis de los intermediarios de replicación mediante

electroforesis bidimensional mostró que las horquillas se detienen en cada uno de los cuatro grupos de “cajas Sal” (López-Estraño y col., 1998) ya que se observó el mismo número de señales de intermediarios acumulados en las que la horquilla se encontraba detenida en cada una de las cajas Sal. Estos resultados, apoyados por otros realizados *in vitro* (Gerber y col., 1997; Pütter y Grummt, 2002), permitieron proponer que en mamíferos, las proteínas terminadoras de la transcripción juegan el papel adicional de bloquear la replicación que progresa en sentido contrario a la transcripción. Por tanto, la terminación de la transcripción y el bloqueo polar de la replicación estarían mediados por la unión de mTTF-1 a las secuencias terminadoras “cajas Sal” (López-Estraño y col., 1998).

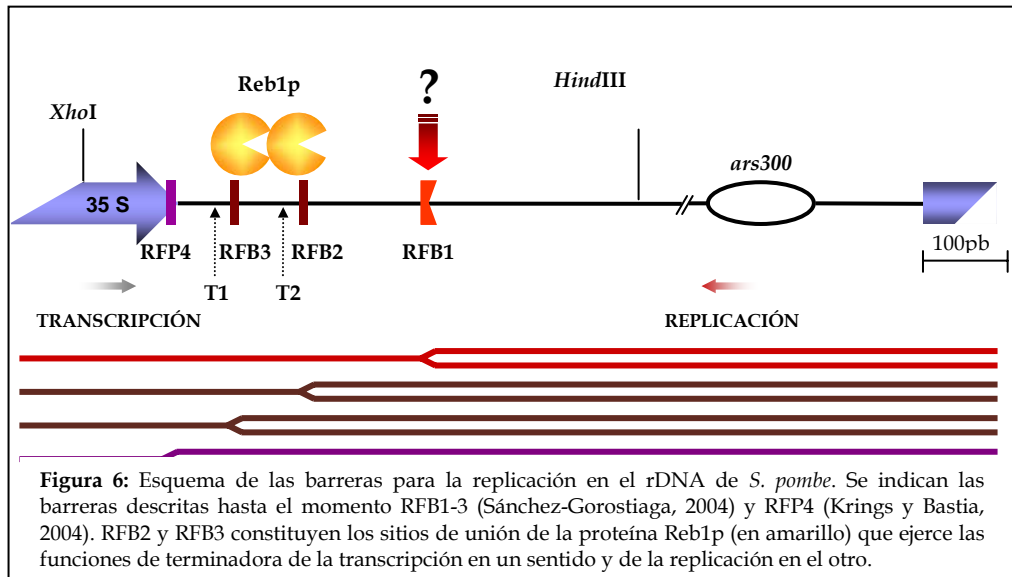
Como se mencionó anteriormente, al contrario de lo que ocurre en ratón, en *S. cerevisiae* el bloqueo de las horquillas en las dos barreras de su rDNA parece ser independiente de los factores *cis* y *trans* involucrados en la terminación de la transcripción. El sitio de unión de la proteína terminadora REB1p, equivalente y homóloga a mTTF-1, no coincide con las secuencias requeridas para RFB1 y RFB2. Además, las barreras no están afectadas en un mutante termosensible de *REB1* creciendo a temperatura restrictiva (Ward y col., 2000).

## **2.5. BARRERAS PARA LA REPLICACIÓN DEL rDNA DE *S. pombe***

El rDNA de *S. pombe* contiene de 100 a 150 copias repetidas en tándem, organizadas en dos *loci* ubicados en cada uno de los extremos del cromosoma III (Balzi y col., 1985; Maleszka y Clark-Walker, 1993; Pasero y Marilley, 1993). La transcripción termina, preferentemente, a 267 pb del extremo 3' del gen 25S maduro (Melekhovets y col., 1997), cerca del primero de los dos sitios de unión de la proteína terminadora Reb1p (Zhao y col., 1997). Se han localizado cuatro barreras para la replicación en esta misma zona del rDNA de *S. pombe*, denominadas de 3' a 5' RFB1, RFB2, RFB3 y RFB4. (Figura 6) (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004, Krings y Bastia 2004). Las secuencias necesarias y suficientes para el bloqueo de la replicación en RFB2 y RFB3, coinciden con los 17 pb de reconocimiento de Reb1p. Además, en un mutante en el que el gen

*reb1<sup>+</sup>* fue deletado, las barreras RFB2 y RFB3 desaparecieron cuando se ensayaron en plásmidos de replicación autónoma, permaneciendo únicamente RFB1 (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004). Cuando se analizaron las barreras en el *locus* ribosómico en este mismo mutante, permanecieron solamente RFB1 y RFP4 (Krings y Bastia, 2004)

Estos datos demuestran que RFB1 y RFP4 son independientes de RFB2 y RFB3, y que estas últimas son dependientes de la proteína terminadora de la transcripción Reb1p. La secuencia requerida para RFB1 ha sido acotada en nuestro laboratorio en una región de 78 pb, entre los nucleótidos +677 y +754 respecto del extremo 3' del gen 25S (Sánchez-Gorostiaga, 2003).



Así mismo, en mutantes *swi1<sup>-</sup>* y *swi3<sup>-</sup>*, las barreras RFB1-3 se inactivan (Krings y Bastia, 2004), lo que indica que estas dos proteínas son requeridas para la función de RFB1-3. Aún no se ha estudiado la naturaleza del sitio de pausa RFP4.

Las diferencias observadas en la replicación del rDNA entre mamíferos y *S. cerevisiae* indican que, si bien sus barreras se han conservado a lo largo de la evolución, los factores que intervienen en el mecanismo molecular responsable y



su regulación podrían haber divergido, de modo que el papel ha sido asumido por los factores de terminación de la transcripción.

Los resultados descritos indican que en *S. pombe* operan, al menos, dos mecanismos distintos e independientes para el bloqueo de la replicación: uno dependiente de los factores implicados en la terminación de la transcripción (RFB2 y RFB3), y otro independiente de este proceso (RFB1 y RFP4). Por lo tanto, *S. pombe* podría constituir una especie intermedia en la que ambos mecanismos descritos en *S. cerevisiae* y mamíferos coexisten.

La parada de la horquilla de replicación, como se mencionó anteriormente, es causa de inestabilidad genómica y dispara los mecanismos de *checkpoint* de replicación, así como los de reparación. Podría decirse que es causa de alerta para la célula y que ésta debe responder ante esas situaciones para evitar esa inestabilidad que puede conducir a reordenamientos genómicos posiblemente deletéreos para la célula. Sin embargo, la integridad de las horquillas detenidas en sitios naturales, no requiere de algunos factores de *checkpoint* ni de recombinación (Calzada y col., 2005). Por tanto, la célula debe de ser capaz de distinguir entre una situación de riesgo provocada por una horquilla detenida de un modo accidental y otra detenida de forma natural.

Recientemente, Calzada y col (2005) han estudiado los componentes del replisoma de *S. cerevisiae* en una horquilla detenida bajo el sistema RFB-FOB1p comparándolos con los presentes en una horquilla detenida a causa de la adición de hidroxurea, agente que produce un descenso de los niveles de desoxiribonucleótidos y provoca la parada accidental de las horquillas de replicación. Entre los componentes del replisoma detenido de forma natural, se detectaron las proteínas TOF1, CSM3 y RRM3. Las dos primeras son homólogas de Swi1p y Swi3p de *S. pombe*, que participan en la estabilización de la horquilla de replicación (Noguchi y col., 2004). Como se mencionó antes, RRM3p es una helicasa que facilita el desplazamiento del replisoma eliminando proteínas no histónicas unidas al DNA. La parada de la horquilla en este sistema RFB-FOB1p no requiere la presencia de Mrc1p, que interviene en la activación de los

mecanismos de *checkpoint* replicativo y parece formar parte del propio replisoma (Katou y col., 2003).

Estos datos indican que los replisomas eucarióticos detenidos de forma programada tienen algunos componentes distintos a los presentes en las horquillas detenidas por daño producido en el DNA o estrés replicativo. Los resultados obtenidos por Calzada y col. (2005) indican que los replisomas eucarióticos bloqueados de forma natural y las detenidas accidentalmente son similares pero son regulados de forma distinta.

Tabla 1: Paradas de las horquillas replicativas no asociadas a lesiones en el DNA (Basado en Hyrien, 2000)

CAUSA	CARACTERÍSTICAS Y ORGANISMO	COMENTARIOS	REFERENCIAS
HÍBRIDOS RNA-DNA	Orígenes ColE1 enfrentados, E. coli		Martin-Parras y col., 1992
	φ29, B. subtilis	In vitro	Elías-Arnanz y Salas, 1999
	T4, E. coli	In vitro	Liu y Alberts, 1995
	Plásmidos ARS, S. cerevisiae	Parada asociada con recombinación	Prado y Aguilera, 2005
	Genes tRNA, S. cerevisiae	tRNA <sup>Glu</sup> , tRNA <sup>Tyr</sup> , tRNA <sup>Arg</sup>	Deshpande y Newlon, 1996
COLISIÓN CON TRANSCRIPCIÓN	Genes rRNA, S. cerevisiae	En estirpes FOB1Δ y bajo número de copias de rDNA	Takeuchi y col., 2003
	Ter-Tus, E. coli	Polar	Hill y col., 1989
	Ter-RTP, B. subtilis	Polar	Carriagan y col., 1987
	FR-EBNA1, Epstein Barr		Dhar y Schildkraut C.L., 1991
	CEN-CBP, S. cerevisiae	Centrómeros I, III y IV	Greenfeder y Newlon, 1992
	RFB-FOB1p, S. cerevisiae	En el rDNA	Kobayashi y Horiuchi, 1996
	RFB2/3-Reb1p, S. pombe	En el rDNA	Sánchez-Gorostiaga y col., 2004
	RTS1-Rtf1p, S. pombe	En el locus mat1	Vengrova y col., 2002
	Cajas Sal-mTTF1, ratón	En el rDNA	López-Estraño y col.,1998
	Telómeros-Proteínas teloméricas, S. pombe	En mutantes Taz1Δ	Miller y col., 2006
COMPLEJOS DNA-PROTEINA	Telómero-Proteínas teloméricas, S. cerevisiae	En mutantes RRM3Δ	Ivessa y col., 2000
	MPS1, S. pombe	En el locus mat1	Dalgaard y Klar, 2000
	RFP4, S. pombe	En el rDNA	Krings y Bastia, 2004

# *OBJETIVOS*

1. Identificación de factores proteicos de unión a la barrera RFB1 del rDNA de *S. pombe*
2. Determinación de los requerimientos de secuencia para la actividad de RFB1.
3. Estudio del requerimiento de la unión de Sap1p a RFB1 para la inducción de parada de las horquillas replicativas del DNA.

# *MATERIALES Y MÉTODOS*

## 1. MATERIALES

### 1.1. Material biológico

#### Estirpes de *Escherichia coli*

**DH5 $\alpha$ F'**: F<sup>-</sup>  $\phi$ 80Z $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)<sub>u169</sub> recA1 endA1 hsdR17 (*r<sub>k</sub>-m<sub>k</sub>*<sup>+</sup>) supE44 thi-1 gyrA96, relA1.

**TOP10**: F<sup>-</sup> *mcrA* $\Delta$  (*mrr*-hsdRMS-*mcrBC*)  $\phi$ 80Z $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 deoR recA1 araD139 (*ara-leu*)7697 galU galK rpsL endA1 nupG (Invitrogen, Hanahan, D.,1983)

#### Estirpes *Schizosaccharomyces pombe*

**S35** (*h*<sup>+</sup>, *leu1-32*)

**S117** (*h*<sup>-</sup>, *leu1-32*, *ura4-D19*, *ade6-M210*)

**D8** (*h*<sup>-</sup>, *leu1-32*, *ura4-D19*, *ade6-M210*, *reb1*<sup>+</sup>)

**D7** (*h*<sup>-</sup>, *leu1-32*, *ura4-D19*, *ade6-M210*, *reb1* $\Delta$ ::*kanMX6*<sup>+</sup>)

**EN3182** (*h*<sup>-</sup>, *leu1-32*, *ura4-D18*, *swi1*::*kan*<sup>r</sup>)

**EN3366** (*h*<sup>-</sup>, *leu1-32*, *ura4-D18*, *swi3*::*kan*<sup>r</sup>)

**sap1-FLAG** (*h*<sup>+</sup>, *sap1-3FLAG*::*kan*<sup>r</sup>, *leu1-32*, *ura4-D18*)

**sap1-1** (*h*<sup>+</sup>, *sap1-1*<sup>ts</sup>-3FLAG::*kan*<sup>r</sup>, *leu1-32*, *ura4-D18*)

**sap1-27** (*h*<sup>+</sup>, *sap1-27*<sup>ts</sup>-3FLAG::*kan*<sup>r</sup>, *leu1-32*, *ura4-D18*)

**sap1-48** (*h*<sup>+</sup>, *sap1-48*<sup>ts</sup>-3FLAG::*kan*<sup>r</sup>, *leu1-32*, *ura4-D18*)

**sap1 $\Delta$ 40-GFP** (*h*<sup>+</sup>, *leu1-32*, *ura4-D18*, *sap1 $\Delta$ 40-GFP*::*hph*)

### 1.2. Medios de cultivo

#### 1.2.1. Medios de cultivo bacteriano

La estirpe de *E. coli* DH5 $\alpha$ F' fue crecida a 37°C en LB líquido (triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, cloruro de sodio 1%) o sólido, conteniendo agar al 1,5%), añadiendo 50-100  $\mu$ g/ $\mu$ l de ampicilina.

En el caso de TOP10, las células se crecieron en el mismo medio añadiendo 0,2% de glucosa en condiciones de represión, o 0,02% de galactosa en condiciones de sobreexpresión.

#### 1.2.2. Medios de cultivo para *S. pombe*

Los medios empleados se prepararon según Moreno y col. (1991) suplementados según necesidad con 0,47 mg/l de adenina, 0,23 mg/l de uracilo y/o 0,47 mg/l de leucina.

Para la selección de estirpes portadoras del gen de resistencia a higromicina (*hph*<sup>+</sup>), higromicina a 100µg/ml.

### **1.3. REACTIVOS, ENZIMAS Y OLIGONUCLEÓTIDOS**

#### **1.3.1. Reactivos generales**

Las sales, ácidos, bases inorgánicas y compuestos orgánicos componentes de los medios de cultivo y de todas las soluciones empleadas proceden de las firmas *DIFCO*, *Merck*, *Pronadisa* y *Sigma*. Empleamos la agarosa *SeaKem LE* (FCM) para los geles bidimensionales.

#### **1.3.2. Enzimas**

Las enzimas de restricción que se han empleado durante el desarrollo de esta tesis han sido suministradas por *New England Biolabs* y *Roche Molecular Biochemicals*.

Para las reacciones de PCR se han empleado las DNA polimerasas recombinantes *Recombitalq (LINUS)* y *Expand High Fidelity PCR System (Roche)*.

Para los clonajes se usó DNA ligasa del bacteriófago T4 (USB). Para el marcaje de oligos se empleó el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (*Roche*). Para otras reacciones se usaron fosfatasa alcalina, RNasa A, proteinasa K (todas de *Roche*), lisozima (*Calbiochem*) y zimoliasa 20T de *Arthreobacter luteus* (ICN)

#### **1.3.3. Oligonucleótidos**

Los desoxioligonucleótidos empleados han sido suministrados por: *Roche*, *Allele Biothechnology* e *IDT*.



**Tabla 2:** Oligonucleótidos empleados en el desarrollo de la tesis. En negrita se indican las dianas de restricción usados para el clonaje.

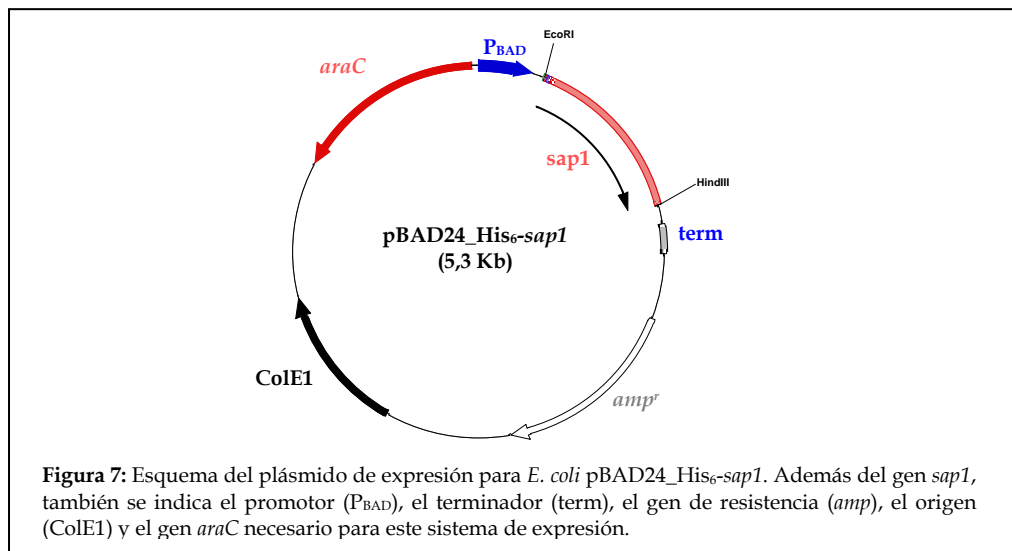
Oligonucleótidos	Secuencia
pIRT2-ars1up	5' -CTGATGGAGGACTCGATTTAATG-3'
pIRT2-leu2do	5' -TCCCATAATGGTGAAAGTTCC-3'
RFB1mut a-fw	5' - <b>GATCC</b> CTTTCTTTAACGCAGTGCAAGGAGCTATCTTGGTGGTG-3'
RFB1mut a-rev	5' - <b>GATCC</b> ACCACCAAGATAGCTCCTTGCACTGCGTTAAAGAAAGG-3'
RFB1mut b-fw	5' - <b>GATCC</b> AGGGATTGCCATCAGTGCAAGGAGCTATCTTGGTGGTG-3'
RFB1mut b-rev	5' - <b>GATCC</b> ACCACCAAGATAGCTCCTTGCACTGATGGCAATCCCTG-3'
RFB1mut c-fw	5' - <b>GATCC</b> AGGGATTTAACGCAGTGACCTTAGCTATCTTGGTGGTG-3'
RFB1mut c-rev	5' - <b>GATCC</b> ACCACCAAGATAGCTAAGGTCAGTGCCTTAAATCCCTG-3'
RFB1mut d-fw	5' - <b>GATCC</b> AGGGATTTAACGCAGTGCAAGGCTAGCGCTTGGTGGTG-3'
RFB1mut d-rev	5' - <b>GATCC</b> ACCACCAAGCGCTAGCCTTGCACTGCGTTAAATCCCTG-3'
RFB1mut e-fw	5' - <b>GATCC</b> AGGGATTTAACGCAGTGCAAGGAGCTATCTTGTGTTGG-3'
RFB1mut e-rev	5' - <b>GATCC</b> CAACACAAGATAGCTCCTTGCACTGCGTTAAATCCCTG-3'
RFB1wt-fw	5' - <b>GATCC</b> AGGGATTTAACGCAGTGCAAGGAGCTATCTTGGTGGTG-3'
RFB1wt-rev	5' - <b>GATCC</b> ACCACCAAGATAGCTCCTTGCACTGCGTTAAATCCCTG-3'
Sap1A40fw	5' -CCGAAAATAAGCGCCTTCAACAACCTTCTCGATCATAACGATTGTGTGCCA AGCTCGAGCCTCCCTCTGCTTACGCTCCCCGGATCCCCGGGTAAATTAA-3'
Sap1tagrev	5' -CCGAATGATTGCGCTTGACACAACTAGGAAGAGGGAGAAATGAAAAGATAT TTACATCAAGCAGACCGTCAGTCAAAAGTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3'
SapEcoHis	5' -CCC <b>GAATTC</b> ACCATGCATCATCATCATCATATGGAAGCTCCCAAGATG GAAGTGAAGAGC-3'
SapHind	5' -CCC <b>AAGCTT</b> GTTGGGATTAATGGTCACCA-3'
SAS1wt-fw	5' - <b>GATCC</b> CCTCTAACGAGATATTGCTTCGCTACGCTACGCG-3'
SAS1wt-rev	5' - <b>GATCC</b> CGTAGCGTAGCGAAGCAAATATCTCGTTAGAGGG-3'
SpI fw	5' - <b>GATCC</b> CCTTGCACTGCGTTAAATCCCTCTCTATT <b>CTGCA</b> -3'
SpI rev	5' - <b>GA</b> TAGGAGAGGGATTTAACGCAGTGCAAGGG-3'
SpII fw	5' - <b>GATCC</b> ACCACCAAGATAGCTCCTTGCACTGCGTT <b>ACTGCA</b> -3'
SpII rev	5' - <b>G</b> TACGCAGTGCAAGGAGCTATCTTGGTGGTG-3'
SpIII fw	5' - <b>GATCC</b> ATTTGAAAAGGGGAACCAAGATAGCT <b>CTGCA</b> -3'
SpIII rev	5' - <b>G</b> AGCTATCTTGGTGGTTCCCCCTTTTCAAATG-3'
SpIV fw	5' - <b>GATCC</b> TTACAAATGGAAGTTGAAATTTGAAAAGGGGG <b>ACTGCA</b> -3'
SpIV rev	5' - <b>G</b> TCCCCCTTTTCAAATTTCAAGTTCCATTTGTAAG-3'
SpRFB3-2	5' -CCC <b>CTGCAGA</b> ATAGGAGAGGGATTTAA-3'
SpRFB3-2bio	5' -Biotina-CCCCTGCAGAATAGGAGAGGGATTTAA-3'
SpRFB3-3up	5' -CCC <b>GGATCCT</b> TACAAATGGAAGTTGAA-3'

## 2. MÉTODOS

### 2.1. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS

#### 2.1.1. Plásmido para la expresión de Sap1p en *E. coli*

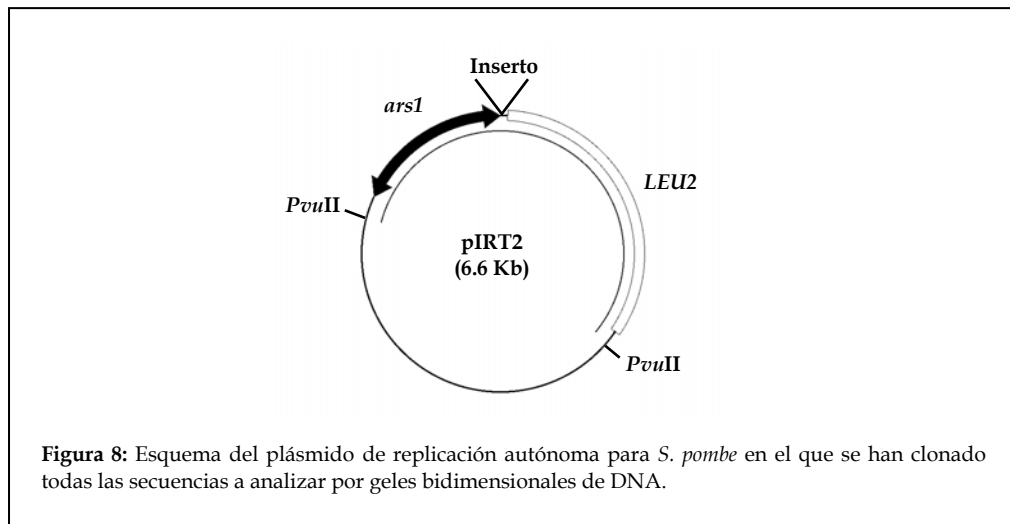
*sap1*<sup>+</sup> se amplificó mediante PCR usando como molde DNA genómico de la estirpe de *S. pombe* S35, y como cebadores los oligonucleótidos SapEcoHis y SapHind. El oligonucleótido SapEcoHis contiene en su extremo 5', justo después de la diana de restricción para *EcoRI* y después del codón de iniciación, seis repeticiones del trinucleótido CAT, con el fin de etiquetar la proteína con seis histidinas en su extremo amino. El producto de PCR contenía las dianas de restricción para *EcoRI* y *HindIII* con las que fue digerido e insertado en el vector de expresión pBAD24 (Tabla 3). El plásmido pBAD24*sap1* (Figura 7) resultante se usó para transformar la estirpe de *E. coli* TOP10.



#### 2.1.2. Plásmidos para el ensayo de las barreras para la replicación del rDNA en *S. pombe*

Todos los fragmentos del DNA cuya replicación fue analizada se introdujeron en el vector de replicación autónoma pIRT2 (Figura 8) (Hindley y col., 1987), que contiene un sitio de clonación múltiple, el origen de replicación *ars1* y el gen *LEU2*, que complementa la auxotrofia producto de la mutación *leu1-32* de las estirpes usadas.

En algunos casos, se indica la orientación del inserto respecto al origen de replicación con los signos (+) o (-) a continuación del nombre. De esta forma distinguimos entre aquellos fragmentos que son replicados en el plásmido en el mismo sentido en el que en su contexto genómico provoca la parada de la horquilla replicativa (+) de los que son replicados en el sentido contrario (-). Cuando no se indica, el fragmento ha sido clonado en la orientación (+) (Tabla 3). En todos los plásmidos la orientación de los fragmentos introducidos se confirmó mediante secuenciación (secuenciador automático *ABi Prism 3700 DNA Analyzer* de *Applied Biosystem*, Servicio de Secuenciación Automática del CIB, CSIC).



Para el plásmido pΔ677-754, el inserto se generó mediante PCR con los oligonucleótidos SpRFB3-2 y SpRFB3-3up. Debido a que el resto de las secuencias a analizar no superaban los 40 pb, estos se obtuvieron por apareamiento de parejas de oligonucleótidos sintéticos de cadena simple (Tabla 2), con las dianas de restricción en sus extremos adecuadas para la clonación. En todos los casos, los oligonucleótidos fueron fosforilados con polinucleótido quinasa y purificadas en columnas de *Sephadex* G-25. Para el anillamiento, los oligonucleótidos se mezclaron a una concentración equimolar en presencia de  $MgCl_2$  3 mM y NaCl 50 mM, desnaturalizadas a 95°C durante 5 min y se dejó bajar la temperatura paulatinamente hasta temperatura ambiente. Los

oligonucleótidos de cadena doble resultantes contenían los extremos cohesivos para ser clonados directamente en el vector pIRT2 previamente digerido. En el caso de los plásmidos p3'RebsΔ2-3 (I), (II), (III) y (IV), las clonaciones se dirigieron a *Bam*HI y *Pst*I. Para el resto, la clonación se realizó en *Bam*HI para obtener las dos orientaciones.

**Tabla 3:** Plásmidos construidos en esta tesis. En la columna de la derecha se especifica la secuencia que se ha insertado en cada caso así como los oligonucleótidos que se han utilizado para obtener el inserto.

<b>Nombre del plásmido</b>	<b>Secuencia insertada y oligonucleótidos empleados</b>
pΔ677-754	Fragmento RFB1 de 78pb (SpRFB3-2/ SpRFB3-3up)
p3'RebsΔ2-3up(I)	Fragmento I de RFB1 de 78pb (SpIfw/SpIrev)
p3'RebsΔ2-3up(II)	Fragmento II de RFB1 de 78pb (SpIIIfw/SpIIrev)
p3'RebsΔ2-3up(III)	Fragmento III de RFB1 de 78pb (SpIIIIfw/SpIIIrev)
p3'RebsΔ2-3up(IV)	Fragmento IV de RFB1 de 78pb (SpIVfW/SpIVrev)
pRFB1mut a (+)	RFB1 mut a (RFB1mut a fw/RFB1mut a rev)
pRFB1mut a (-)	RFB1 mut a (RFB1mut a fw/RFB1mut a rev)
pRFB1mut b (+)	RFB1 mut b (RFB1mut b fw/RFB1mut b rev)
pRFB1mut b (-)	RFB1 mut b (RFB1mut b fw/RFB1mut b rev)
pRFB1mut c (+)	RFB1 mut c (RFB1mut c fw/RFB1mut c rev)
pRFB1mut c (-)	RFB1 mut c (RFB1mut c fw/RFB1mut c rev)
pRFB1mut d (+)	RFB1 mut d (RFB1mut d fw/RFB1mut d rev)
pRFB1mut d (-)	RFB1 mut d (RFB1mut d fw/RFB1mut d rev)
pRFB1mut e (+)	RFB1 mut e (RFB1mut e fw/RFB1mut e rev)
pRFB1mut e (-)	RFB1 mut e (RFB1mut e fw/RFB1mut e rev)
pRFB1 wt (+)	RFB1 wt (RFB1wt fw/RFB1wt rev)
pRFB1 wt (-)	RFB1 wt (RFB1wt fw/RFB1wt rev)
pSAS1 (+)	SAS1 wt (SAS1wt fw/SAS1wt rev)
pSAS1 (-)	SAS1 wt (SAS1wt fw/SAS1wt rev)
pBAD24_His6-sap1	his6-sap1 <sup>+</sup> (SapEcoHis/ SapHind)

## 2.2. CONSTRUCCIÓN DE LA ESTIRPE sap1Δ40-GFP

Se transformó una estirpe silvestre con un producto de PCR, el cual se integraría eliminando la secuencia de DNA que codifica para los últimos 40 aminoácidos de Sap1p introduciendo una cola de GFP a la proteína y el gen de resistencia a higromicina (*hph*<sup>+</sup>) como marcador. Se utilizaron como oligonucleótidos Sap1Δ40 y Sap1tagrev (Tabla 2), los cuales contienen 80 pb homólogos en 5' y en 3' de la zona a deletar. Como molde se empleó el plásmido pFA6a-GFP(S65T)-hphMX6 (Sato y col., 2005). Con este producto de

PCR se transformó una estirpe salvaje haploide mediante electroporación (apartado 2.3.2.) y se plaqueó en medio selectivo con el antibiótico higromicina.

## 2.3. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS

### 2.3.1. Transformación de *E. coli*

Para preparar las células competentes de *E. coli* y transformarlas se utilizaron los métodos de cloruro de rubidio y choque térmico, descritos por Hanahan y col., (1986).

### 2.3.2. Transformación de *S. pombe*

Todas las estirpes de *S. pombe* se transformaron mediante electroporación, según el protocolo descrito por H. L. Prentice (1992).

## 2.4. EXTRACCIÓN DE DNA

### 2.4.1. Extracción de DNA de *E. coli*

Para la purificación a pequeña escala del DNA plasmídico de *E. coli* se utilizó el kit *High pure plasmid isolation*, de Roche Molecular Biochemicals.

### 2.4.2. Extracción de DNA de *S. pombe*

#### Extracción de DNA para el análisis de transformantes

Se partió de cultivos saturados de 10 ml, lo cuales fueron centrifugados a 3000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Las células se resuspendieron en 1 ml de tampón citrato/fosfato (citrato/fosfato 50 mM a pH 5,6; EDTA 40 mM a pH 8,0 y sorbitol 1,2 M) al que se añadió 1,5 mg de zimoliasa 20T. Las células se incubaron 15-30 min en esta solución a 37°C, para digerir la pared celular. Los protoplastos se recogieron por centrifugación durante 10 s en microfuga y se lisaron en 550 µl de una solución al 10% de SDS en TE (Tris-HCl 10mM y EDTA 1mM). A continuación se agregaron 175 µl de acetato potásico 5 M y se incubó a 4°C durante 5 min. Después de centrifugar a 14500 rpm a 4°C durante 15 min para eliminar los restos celulares, los ácidos nucleicos fueron precipitados añadiendo al sobrenadante un volumen igual de isopropanol. La mezcla se mantuvo a -20°C durante 10 min, se centrifugó en las mismas condiciones anteriores y el *pellet* se resuspendió en 350 µl de 50 µg/ml de RNasa A en TE. Después de una incubación a 65°C durante 10 min, los ácidos nucleicos se desproteinizaron con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1)

(PCIA). Finalmente, el DNA se precipitó con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2,5 volúmenes de etanol al 100% frío. Las muestras se centrifugaron a 14500 rpm a 4°C durante 15 min, se lavaron con etanol al 70% y se resuspendieron en 50 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada.

### **Aislamiento de DNA para el análisis de la replicación genómica**

El método empleado se basó en el descrito por J. A. Huberman (1987) y Krings y Bastia (2004) con modificaciones. Los cultivos crecidos hasta fase exponencial se detuvieron por adición de azida sódica hasta 0,1% y se enfriaron en hielo durante 10 min. Seguidamente, las células se lavaron con agua destilada y los *pellets* se guardaron a -80°C hasta su procesamiento.

Para la extracción de DNA, las células fueron resuspendidas en 5 ml de solución NIB (glicerol 17%, MOPS 50 mM pH 7,2; acetato potásico 150 mM, Mg<sub>2</sub>Cl 2 mM, espermidina 500 µM, espermina 150 µM, zimoliasa 1,5 mg/ml) y se incubaron a 37°C durante 30 min. Para confirmar la digestión de la pared se comprobó la lisis celular al microscopio óptico añadiendo SDS al 1% a una alícuota de 2 µl. Seguidamente, los protoplastos se diluyeron hasta 25 ml con agua destilada a 4°C y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min. Se procedió a la lisis celular resuspendiendo el *pellet* en 5 ml de tampón TEN<sub>50-50-100</sub> (Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM y NaCl 100 mM) que contenía además SDS al 0,1% y 300 µg/ml de proteinasa K, incubando la suspensión durante 1 h a 37°C. A continuación, se ajustó el SDS a una concentración final de 1% y se incubó 1 h más a 37°C y, luego, 2 h a 4°C. Seguidamente, se añadió acetato potásico hasta una concentración final de 1 M y se incubó 1 h más. La muestra fue centrifugada a 9000 rpm a 4°C durante 10 min y se añadió al sobrenadante un volumen igual de isopropanol a temperatura ambiente para luego volver a centrifugar en las mismas condiciones. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* se resuspendió en 4 ml de TE a 4°C durante unas 16 h. Se procedió después a la desproteinización del DNA mediante la extracción sucesiva con PCIA (25:24:1) y una vez más con CIA (24:1). Para precipitar el DNA se añadió acetato potásico hasta 0,3 M y etanol al 100% a temperatura ambiente y se centrifugó a 9000 rpm a la misma temperatura durante 10 min. El *pellet* se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 400 µl de TE y se guardó a 4°C hasta su utilización. Para su análisis mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa se usaron 10

µg de DNA total digeridos con la enzima adecuada en cada caso así como con RNAsa A a 0,1 µg/ml.

#### **Purificación de DNA para el análisis de la replicación plasmídica**

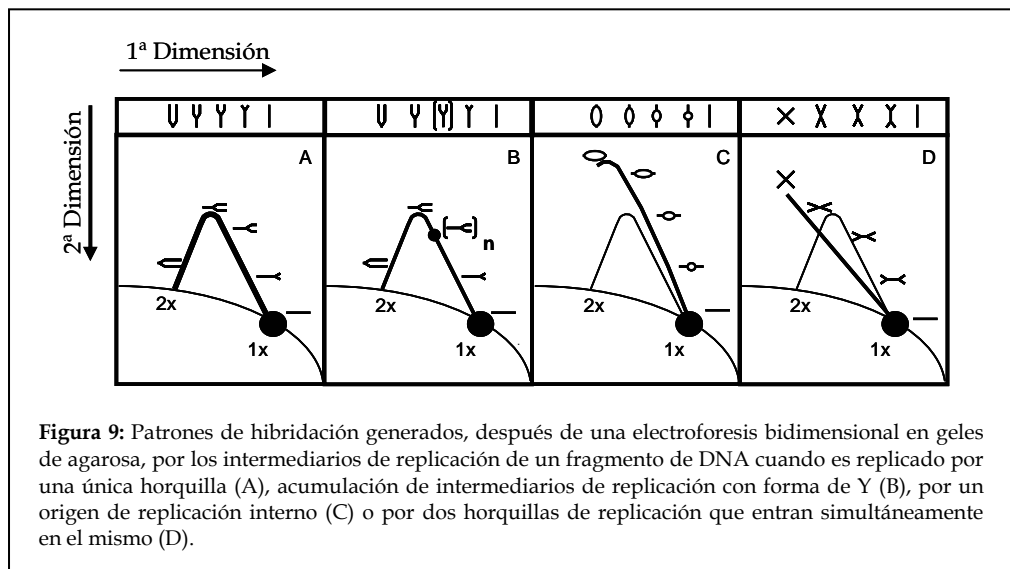
El protocolo está basado en el descrito por Caddle y Calos (1994) con modificaciones. Las células de cultivos exponenciales de 100 ml de las estirpes a estudiar se lavaron dos veces con agua destilada y se congelaron a -20°C durante dos o más días. Para la extracción, se resuspendieron las células en 5ml de tampón citrato/fosfato con zimoliasa a 1,5 mg/ml y se incubaron a 37°C durante 15 min. Tras comprobar la digestión de la pared como se describió anteriormente los protoplastos se recogieron por centrifugación (2000 rpm, temperatura ambiente durante 10 min), y se resuspendieron en 5 ml de TE<sub>50-50</sub> (Tris-HCl 50 mM a pH 8,0 y EDTA 50 mM a pH 8,0) con Sarcosil-NL 30 al 1,5% y 300 µg/ml de proteinasa K y se incubaron a 37°C durante 1 h. La desproteinización de ácidos nucleicos se realizó mediante extracciones sucesivas con PCIA hasta que desapareciera la interfase de color blanco seguidas de una extracción final con CIA. Los ácidos nucleicos se precipitaron seguidamente con 2,5 volúmenes de etanol al 100% a temperatura ambiente. Por último, se centrifugaron las muestras durante 60 min a 13000 rpm y el *pellet* se resuspendió en 200 µl de agua destilada estéril a 4°C durante 24 h. Para su análisis mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa se usaron 5 µg de DNA total para ser digeridos con la enzima adecuada en cada caso así como con RNAsa A a 0,1 µg/ml.

### **2.5. ANÁLISIS DE LOS INTERMEDIARIOS DE REPLICACIÓN MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN GELES DE AGAROSA**

Este sistema se basa en que la forma de las moléculas de DNA, además del tamaño, influye sobre su movilidad electroforética. Esta técnica se desarrolló inicialmente para el análisis de los intermediarios de recombinación (Bell y Byers, 1983), y Brewer y Fangman (1987) la aplicaron al estudio de los intermediarios de replicación

La electroforesis bidimensional en geles de agarosa permite conocer de qué modo es replicado un fragmento de restricción específico *in vivo*. El DNA total

de las células en estudio es digerido con las enzimas de restricción apropiadas. La muestra digerida se somete a una primera electroforesis cuyas condiciones permiten que los diferentes fragmentos de restricción generados se separen por su tamaño, sin que la morfología de los mismos afecte a su movilidad bajo un campo eléctrico: baja concentración de agarosa y bajo voltaje. La segunda dimensión se desarrolla en condiciones en las que la forma del fragmento influye notablemente sobre su movilidad electroforética: alta concentración de agarosa, alto voltaje y presencia de bromuro de etidio. El DNA del gel resultante es transferido e hibridado con una sonda específica para el fragmento cuya replicación se está analizando. La Figura 9 ilustra el modo en que migra un fragmento en estudio después de la segunda dimensión dependiendo del modo de replicación del mismo. Se pueden definir tres patrones básicos de hibridación.



- Cuando el fragmento es replicado por una horquilla que lo recorre de un extremo a otro se genera el patrón denominado "Y" (Figura 9, panel A).
- Si el fragmento en estudio contiene un origen de replicación, se genera el patrón de "burbuja" (Figura 9, panel C)



- c) Cuando el fragmento es replicado por dos horquillas convergentes se genera el patrón de “Y doble” (Figura 9, panel D)

Esta técnica también permite identificar si la replicación se detiene en alguna región dentro del fragmento de restricción analizado. Cuando este es el caso, se genera una señal de hibridación más intensa, debido a que el intermediario de la replicación correspondiente se acumula y es más abundante que el resto (Figura 9, panel B). La posición de esta señal permite localizar la zona del fragmento donde se detiene la horquilla y determinar la polaridad de la barrera respecto del sentido de la replicación.

En esta tesis, en la que se han analizado fragmentos con un tamaño de entre 3 y 4 kb, la primera dimensión se desarrolló en agarosa al 0,4% en TBE 1X a temperatura ambiente y a 1V/cm, durante unas 24 h. La segunda dimensión se realizó en presencia de bromuro de etidio a 0,3 µg/ml en agarosa al 1% en TBE 1X a 4°C y a 5 V/cm durante 8 o 10 h.

### **2.5.1. Transferencia, marcaje e hibridación del DNA separado en geles de agarosa**

#### **Transferencia de DNA**

Una vez realizada la electroforesis, los geles se trataron con ácido clorhídrico 0,25 M durante 15 min tras lo cual se lavaron con agua destilada. El DNA se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon (Zeta Probe, BioRad) con una solución de hidróxido de sodio 0,4 N.

#### **Marcaje radiactivo de sondas para la hibridación**

Las diferentes sondas empleadas durante el desarrollo del trabajo se marcaron con 40 µCi del precursor radiactivo { $\alpha$ -<sup>32</sup>P}dCTP, mediante la técnica de *random priming extension* utilizando el kit *Ready-to-go* de Amersham-Pharmacia. Los dNTPs no incorporados se eliminaron mediante cromatografía en Sephadex G-50 de la misma casa comercial.

#### **Hibridación**

La solución empleada para hibridar el DNA consistió en SSPE 2X (NaCl 360 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 20 mM y EDTA 2 mM a pH 8,0); leche descremada en polvo al 0,5%; sulfato de dextrano al 10%; SDS al 1% y 0,5 mg/ml de DNA de esperma de salmón, sonificado y desnaturalizado. En todos los casos se incubó la

membrana en esta solución entre 15 min y 4 h a 65°C, y después se añadió la sonda marcada y desnaturalizada ( $1 \times 10^6$  cpm/ml) continuando la incubación 16 h más a 65°C. Finalizado el tiempo de hibridación las membranas fueron lavadas sucesivamente con SSC 2X/SDS 0,1%; SSC 0,5X/SDS 0,1% y SSC 0,1X/SDS 0,1% a 65°C durante 15 min en cada caso (SSC 1X: NaCl 6 M, citrato sódico 15 mM). Para las autorradiografías se usaron películas AGFA Curix RP2.

## 2.6. PREPARACIÓN DE PROTEÍNAS.

### 2.6.1. Expresión de His<sub>6</sub>-Sap1p en *E. coli*

La estirpe TOP10 de *E. coli* fue transformada con el plásmido pBAD24-His<sub>6</sub>-sap1, cuya construcción se describió anteriormente (apartado 2.1.1.). Las células con dicho plásmido fueron crecidas hasta saturación en 50 ml de medio en condiciones de represión de la expresión de Sap1p por adición de 0,2 % de glucosa. El cultivo se diluyó hasta  $2 \times 10^7$  células/ml y se creció en 500 ml del mismo medio hasta  $2,5 \times 10^8$  células/ml. Las células fueron centrifugadas a 3000 rpm a temperatura ambiente durante 5 min y lavadas en medio inductor de la expresión (LB con 0,02% de L(+)-arabinosa). Después del lavado, las células se resuspendieron también en medio inductor y se dejaron crecer durante 2 h. Transcurrido este tiempo, las células se recogieron por centrifugación y se guardaron a -80°C hasta su procesamiento.

### 2.6.2. Extracción de proteínas totales de *E. coli*

Las células procedentes de la expresión de His<sub>6</sub>-Sap1p fueron resuspendidas en 15 ml de solución de extracción (KCl 1 M a pH 8,0; Imidazol a 50 mM a pH 8,0; lisozima 0,03 mg/ml; Britj-58 al 1% y dihidrocloruro de paraaminobenzamidina 1 mM). La suspensión celular se sometió a ultrasonido durante 3 ciclos de 30 s con descansos en hielo de 2 min y se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 1 h para eliminar los restos celulares. Se midió la concentración de proteínas mediante *Bradford* y se guardó en alícuotas a -80°C (Giraldo y Díaz-Orejas, 2001).

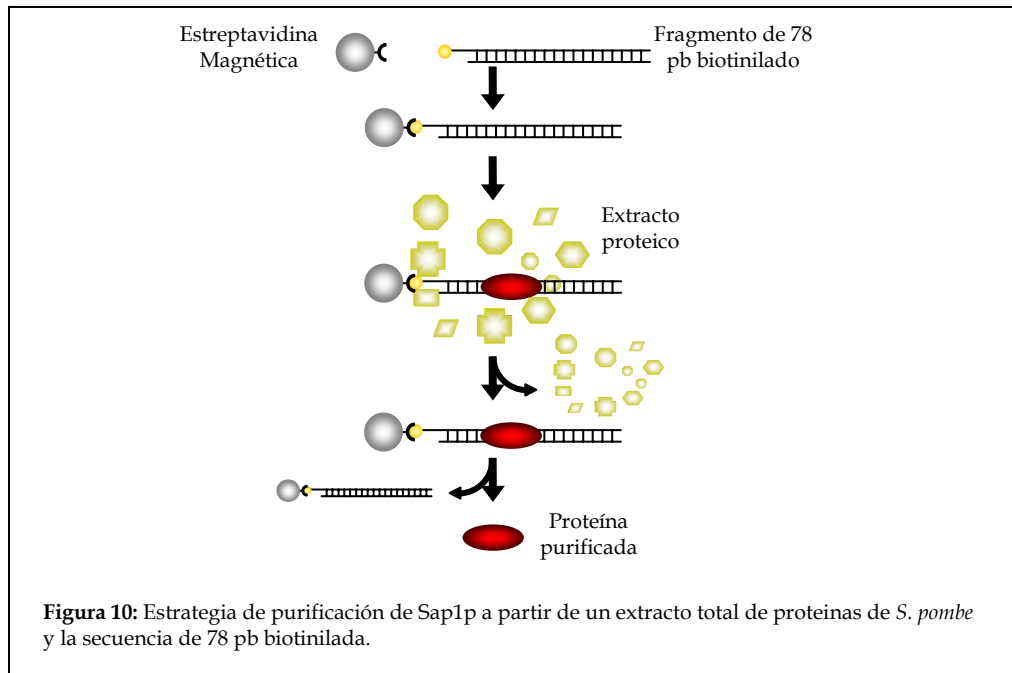
### 2.6.3. Purificación de His<sub>6</sub>-Sap1p por afinidad en columnas de Ni

Este protocolo de purificación está basado en el descrito en Giraldo y col. (1998).

La cromatografía se llevó a cabo 4°C en un equipo estándar de *Pharmacia*. La columna utilizada fue XK-16/20 (*Pharmacia*), en la cual se empaquetaron 12 ml de sefarosa quelante (*Chelating Sepharose Fast-Flow, Pharmacia*). El contenido de la columna se activó con NiCl<sub>2</sub> en exceso y se equilibró con al menos 10 volúmenes de solución A (KCl 1 M, Imidazol-HCl 50 mM, pH 8,0). Una vez equilibrada la columna, se cargaron en ella 45 ml de la fracción soluble procedente de la lisis celular de 1,5 l de cultivo saturado, con un flujo de 2 ml/min, tras lo cual se lavó la columna con la solución A. La elución se realizó con 250 ml de un gradiente lineal de imidazol desde 50 mM hasta 300 mM, utilizando la solución A y la solución B (KCl 1 M, Imidazol-HCl 300 mM, pH 8,0) a una velocidad de flujo de 1 ml/min y recogiendo fracciones de 5 ml. La detección del pico de elución se realizó mediante un equipo de detección de *Pharmacia*. Las fracciones recogidas fueron analizadas en un gel SDS-PAGE al 12%. Las fracciones enriquecidas en His<sub>6</sub>-Sap1p se juntaron para ser dializadas durante 48 h frente a 4l de glicerol al 10%, Hepes 20 mM pH 7,6; KCl 0,5 M; EDTA 0,1 mM y DTT (ditiotreitól) 2 mM. Finalmente, la concentración de proteína se estimó mediante espectrofotometría (*Ultrospec 3300pro, Amersham Bioscience*) y la muestra se almacenó en alícuotas a -80°C.

#### **2.6.4. Extracción de proteínas totales de *S. pombe***

En todos los casos se partió de cultivos de 100 ml a una densidad de unas 1x10<sup>7</sup> células/ml. Las células se recogieron mediante centrifugación a 3000 rpm a 4°C durante 5 min, se lavaron en agua destilada fría y se guardaron a -80°C para su posterior procesamiento. Para la extracción, las células fueron resuspendidas en 40 µl de solución lisis (Hepes 25 mM pH 7,6; EDTA 0,1 mM; KCl 150 mM; Triton X100 al 0,1%; urea 1 mM, glicerol al 25%; leupeptina 4 µg/ml; pepstatina 2 µg/ml; aprotinina 2 µg/ml y PMSF 0,2 mM). La rotura de la pared celular se realizó añadiendo 1 ml de esferas de vidrio (425-600 micras de diámetro, *Sigma*) y utilizando el equipo FastPrep (BIO101/ThermoSavant) en 6 ciclos a una velocidad de 5 (prefijada por el aparato) a 4°C durante 20s. Finalmente, se añadieron 600 µl de solución de lisis fría y se centrifugaron las muestras a 4°C durante unos segundos. Se recogió el sobrenadante y se centrifugó de nuevo durante 20 min. Se estimó la concentración de proteína de este segundo sobrenadante mediante *Bradford* y se guardó a -80°C en alícuotas.



### 2.6.5. Purificación de Sap1p a partir de un extracto de proteínas totales de *S. pombe*

La estrategia de purificación consistió en la utilización de esferas magnéticas, basándose en el protocolo descrito por Gabrielsen y Huet (1993) que se ilustra en la Figura 10. Se emplearon esferas magnéticas unidas a estreptavidina (*Roche*) a las que se unió el producto de PCR biotinilado generado con los primers SpRFB3-3up y SpRFB3-2-Bio que contiene la secuencia RFB1 que reconoce Sap1p. Se utilizaron unos 54  $\mu\text{g}$  de este DNA biontinilado para unirlos a 0,5 mg de Streptavidina magnética. Para el equilibrado de la estreptavidina magnética y para su unión al DNA biotinilado se siguieron las especificaciones del producto. A continuación se añadieron 13 mg de un extracto proteico procedente de la estirpe D8 de *S. pombe* y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min con agitación ocasional. Las condiciones de unión proteína-DNA se detallan en el apartado 2.7.1. Para eliminar las proteínas de unión inespecífica al DNA, las esferas magnéticas se lavaron dos veces con la misma solución en la que se realizó la reacción de unión DNA-proteína. Seguidamente, las proteínas específicamente unidas al DNA se eluyeron con la solución de

elución (KCl 1M, Hepes 25 mM a pH 7,6; EDTA 25 mM y DTT 0,5 mM) durante 15 min a temperatura ambiente con agitación ocasional. El material eluído se dializó y concentró en columnas *Microcon YM-100* (Millipore). Las proteínas purificadas se analizaron mediante SDS-PAGE al 12% durante 2 h a 100 V.

### 2.6.6. Generación de suero policlonal anti-Sap1p en conejo

La inmunización se realizó en las instalaciones del animalario del Centro de Investigaciones Biológicas. Se utilizaron 2 conejos hembra raza neozelandesa. Previo a la inmunización se extrajeron 40 ml de sangre de cada uno de los conejos para obtener suero preinmune. Se realizaron cuatro inmunizaciones separadas por 15 días, la primera con 250 µg de His<sub>6</sub>-Sap1p en adyuvante completo (*Freund's Adjuvant Complete, Sigma*) y el resto con 100 µg de proteína en adyuvante incompleto (*Freund's Adjuvant Incomplete, Sigma*). Finalmente, se recogieron 150 ml de sangre por animal. Se dejó coagular la sangre 4h a temperatura ambiente y se incubó durante 16 h a 4°C. Para separar el suero de las células sanguíneas, se centrifugaron las muestras a 2000 rpm a 4°C durante 20 min y el sobrenadante se repartió en alícuotas y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

## 2.7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

### 2.7.1. Ensayos del cambio de la movilidad electroforética (EMSA) para el análisis de la formación de complejos DNA-proteína

Los fragmentos de DNA empleados en los ensayos EMSA se obtuvieron mediante PCR a partir de los plásmidos que contenían las secuencias a analizar. El fragmento de 78 pb que contenía RFB1 se obtuvo utilizando los oligonucleótidos SpRFB3-2 y SpRFB3-3up y utilizando como molde pIRT1.6(+) (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004). El producto de PCR se digirió con *Bam*HI para crear un extremo susceptible de ser marcado por la actividad DNA polimerasa. El resto de fragmentos utilizados en estos ensayos se generaron usando los oligos pIRT2-ars1up y pIRT2-leu2do y digeridos posteriormente con *Bam*HI + *Hind*III o con *Bam*HI. El marcaje se realizó usando 2 unidades del fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I de *E. coli* (*Roche*), 10-80 µCi de { $\alpha$ -<sup>32</sup>P}dCTP y una mezcla de dATP, dGTP y dTTP, a 166 µM cada una, en 30 µl de tampón de

reacción (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1 mM y NaCl 100 mM). La reacción se extendió durante 20 min a temperatura ambiente, se añadió seguidamente 1 µl de una mezcla de dNTPs a 0,3 mM cada uno y se incubó otros 15 min. Finalmente, los fragmentos marcados se purificaron en columnas de Sephadex G-25 (Roche).

Las reacciones de unión DNA-proteína se realizaron en un volumen final de 20 µl conteniendo cantidades diferentes, en cada caso, de proteínas en glicerol al 10%; Hepes 25 mM a pH 7,6; KCl 810 mM- 34 mM, indicado en cada caso; poli (dI dC) 0,1 µg/µl y DNA de esperma de salmón sonificado 0,1 µg/µl. El primer EMSA se realizó, además, con 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, y en el resto se eliminó el MgCl<sub>2</sub> y se añadió EDTA hasta 10 mM. Después de una preincubación de 5 min a temperatura ambiente, se añadieron de 0,04 a 0,8 ng del DNA marcado (10000 cpm) y un exceso del mismo fragmento no marcado en el caso de las reacciones de competición realizadas para confirmar la especificidad. Tras 20 min de reacción a temperatura ambiente, se añadieron 4 µl de azul de bromofenol al 0,008% y glicerol al 80%. Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 6% (acrilamida:bisacrilamida 29:1) en TBE 0,5X. La electroforesis se desarrolló en este mismo tampón a 10 V/cm durante 2,5 h a 4°C. Finalmente, el gel se secó al vacío sobre papel 3MM y se autorradiografió.

### 2.7.2. Separación electroforética de proteínas e inmunodetección.

La separación de proteínas se realizó bajo condiciones reductoras en geles de SDS-poliacrilamida al 10% o al 12% en una solución Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 1%. Se utilizaron dos equipos de separación electroforética: *Mini-Protean* (BioRad) y *SE-245 Mini-Vertical Unit* (Pharmacia Biotech). Los geles se transfirieron a membranas de PVDF (*Immun-Blot PVDF Membrane*, BioRad) mediante electrotransferencia húmeda (*Mini-Protean*, BioRad) y semiseca (*Trans-Blot®SD Semi-Dry Transfer Cell*, BioRad). En el primer caso, la transferencia se llevó a cabo en Tris 25 mM y glicina 192 mM a 30 V durante 2 h y a 4°C. En el segundo caso, se utilizó como tampón Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1% y metanol al 20% y la transferencia se llevó a cabo a 12V durante 1,5h a temperatura ambiente. Para la detección de Sap1p en *wetern blots* se emplearon

dos anticuerpos: *Anti-His<sub>6</sub>-Peroxidase (Roche)* y anti-sap1p (generado en esta tesis) a una dilución de 1:5000 y 1:100-10000, respectivamente.

Para la inmunodetección, las membranas se bloquearon con leche descremada en polvo al 5% en TBST (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM y Tween-20 al 0,1%) a 4°C durante toda la noche con agitación suave. La incubación con el anticuerpo primario se realizó en la solución de bloqueo anterior a temperatura ambiente durante 2 h. Después, las membranas fueron lavadas tres veces durante 20 min con TBST. Cuando se usó como anticuerpo primario anti-Sap1p, el anticuerpo secundario empleado fue anti-conejo procedente de cabra, conjugado con peroxidasa (*goat anti-rabbit IgG-HRP sc-2030, Santa Cruz Biotechnology*). La dilución usada fue entre 1:300 y 1:30000. Después, se lavaron las membranas en TBST para proceder al revelado. El sistema de detección usado fue *SuperSignal®West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce)*. Para las exposiciones se emplearon películas *AGFA Curix RP2*.

### 2.7.3. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.

La identificación de Sap1p fue llevada a cabo mediante espectrometría de masas por el servicio de proteómica del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” en la Universidad Autónoma de Madrid. Los datos se procesaron usando dos rutinas distintas de búsqueda, *Mascot* y *Profound*.

## 2.8. ANÁLISIS DE CÉLULAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Se fijaron  $10^7$  células en 1 ml de etanol al 70% frío después de un lavado con 1 ml de agua destilada. A continuación se procesaron 300 µl de muestra fijada, lavándola con 1 ml de citrato de sodio 50 mM. Seguidamente se resuspendió la muestra en 500 µl de dicho tampón conteniendo 100 µg/ml de RNasa A y se incubó a 37°C durante 2h. A continuación se añadieron 500 µl del mismo tampón conteniendo 4 µg/ml de yoduro de propidio y se sonicaron las muestras durante 10 s al 30% de potencia. Finalmente las células fueron procesadas en el Servicio de Citometría de Flujo del CIB (CSIC) usando un separador modelo *FACS Vantage* de *Becton Dickinson*.

## 2.9. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE *S. pombe*

### 2.9.1. Fijación en etanol al 70% y tinción con DAPI

Se tomaron muestras de unas  $1 \times 10^7$  células en fase de crecimiento exponencial, se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min y se añadió al *pellet* 1ml de etanol al 70% frío mientras se agita el tubo en vórtex para fijarlas. Las células fijadas se guardaron a 4°C hasta su utilización.

En el momento de hacer la preparación, se tomaron 10  $\mu$ l de las células fijadas, se hidrataron con 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada o PBS y se recogieron por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min. Después, las células se resuspendieron en 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada o PBS. Para la tinción con DAPI, se añadió a las células rehidratadas 1  $\mu$ l de una solución que contenía DAPI 10  $\mu$ g/ml y p-fenilendiamina 10 mg/ml, mezclando suavemente. Sobre un portaobjetos se depositaron unos 4 $\mu$ l de células ya teñidas y se colocó un cubreobjetos. Las imágenes de las células se capturaron en un microscopio con cámara (Microscopio *Axioplan Universal* de Zeiss, con cámara digital *Leica DFC 350 FX*).

### 2.9.2. Inmunocitoquímica en *S. pombe*.

Para la inmunodetección de la proteína Sap1 se utilizaron células procedentes de cultivos de 30ml en fase logarítmica, las cuales fueron concentradas por filtración a través de *Whatman GF/C* y fijadas con metanol a -20°C. Antes de su utilización, las células fueron rehidratadas mediante lavados sucesivos de 5 min con metanol al 75%, 50%, 25% y 0% en PBS a temperatura ambiente. Para la digestión de la pared celular, las levaduras se equilibraron en sorbitol 1,2 M en PBS y se añadió zimoliasa 1 mg/ml. Tras la digestión de 30 min en agitación suave, las células fueron resuspendidas en TritónX-100 al 1% en PBS, centrifugadas y lavadas tres veces con PBS. Para el reconocimiento con el anticuerpo primario anti-Sap1, las células fueron resuspendidas en tampón PBAL (lisina-HCl 100 mM y BSA al 1% en PBS) a temperatura ambiente con agitación suave. Una vez resuspendidas, se centrifugaron para eliminar el tampón y se resuspendieron suavemente en el anticuerpo a una dilución 1:100 en 100  $\mu$ l de PBAL. Seguidamente, las células se incubaron durante una noche a 4°C tras lo cual se lavaron tres veces con PBAL durante 5 min los dos primeros lavados y 20 min el último, resuspendiendo suavemente en cada lavado. Para la



detección con el anticuerpo secundario (*Alexa 488 anti-rabbit A-11001, M. Probes*; *Alexa 546 anti-rabbit IgG, A-11010, M. Probes*), las células fueron resuspendidas en una dilución 1:300 de dicho anticuerpo en PBAL y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizaron tres lavados del mismo modo que para el anticuerpo primario y, finalmente, después del último lavado, las células fueron resuspendidas en PBS.

Las células se tiñeron con DAPI y se montaron en cubreobjetos para su observación al microscopio en el mismo equipo de mencionado en el apartado anterior.

## *RESULTADOS*

## 1. ESTUDIO DE LOS FACTORES DE UNIÓN A RFB1

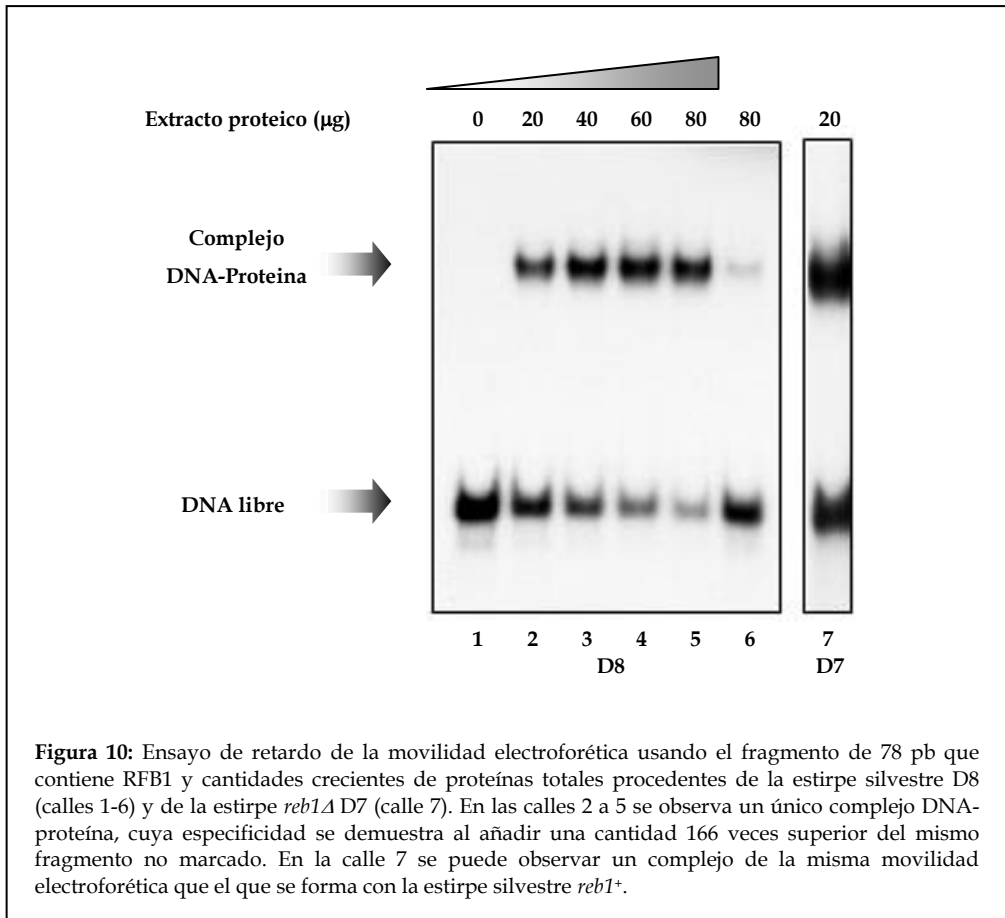
En el rDNA de *S. pombe* se han definido cuatro barreras para las horquillas de replicación denominadas RFB1, RFB2, RFB3 (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004) y RFP4 (Krings y Bastia., 2004). Las secuencias necesarias y suficientes para las barreras RFB2 y RFB3 se han caracterizado previamente en nuestro laboratorio de forma exhaustiva (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004), habiéndose demostrado también que la proteína terminadora de la transcripción del rDNA Reb1p en los genes rRNA es necesaria para la parada de la replicación mediante su unión a RFB2 y RFB3. Sin embargo, las otras dos seguían siendo una incógnita. En cuanto a la barrera RFB1, la cual es la más potente de las cuatro y la primera con la que se encuentra la horquilla de replicación, nuestro laboratorio sólo llegó a definir una secuencia mínima de 78 pb suficiente para la parada de la horquilla (Sánchez-Gorostiaga, 2003).

Esta secuencia de 78 pb no presentaba ninguna característica especial que pudiera inducir alguna estructura secundaria capaz de detener al complejo replicativo. Ya que RFB2 y RFB3 son dependientes de la unión de la proteína Reb1p, se consideró la posibilidad de que RFB1 necesitara también uno o más factores proteicos en *trans* que se unieran directamente al DNA en RFB1. Con el objeto de comprobar esta hipótesis, se realizó un ensayo de cambio de la movilidad electroforética (EMSA) utilizando el fragmento de 78 pb mencionado como sonda y un extracto de proteínas totales de una estirpe silvestre de *S. pombe*.

El resultado confirmó que existe al menos una proteína que se une a RFB1 formando un complejo DNA-proteína estable (Figura 10). La abundancia del complejo aumenta conforme se incrementa la cantidad de proteínas en el ensayo (Figura 10, calles 2-5). La especificidad de este complejo se verificó mediante la adición de un exceso de sonda no marcada a la reacción (figura 10, calle 6).

Para comprobar si esta proteína era distinta de Reb1p, se realizó el mismo utilizando un extracto proteico procedente de la estirpe *reb1Δ* (D7), en la que Reb1p está ausente. Como se puede observar en la calle 7 de la Figura 10, se obtuvo una señal retardada correspondiente a un complejo con la misma

movilidad que aquél que se obtuvo utilizando la estirpe silvestre. Con lo cual, existe al menos una proteína, distinta de Reb1p, que se une específicamente a RFB1 *in vitro*. A partir de este momento, denominamos a esta proteína de unión a RFB1 como Rfb1p, hasta su identificación.



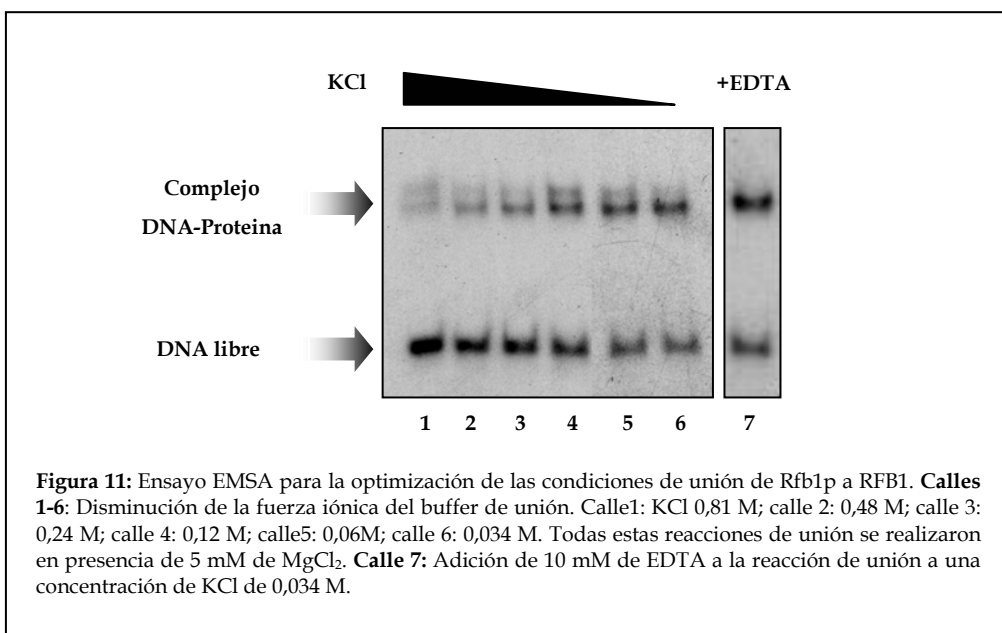
Se decidió purificar Rfb1p, para su posterior identificación mediante técnicas bioquímicas.

La técnica usada se basó en el protocolo de purificación por afinidad, utilizando como señuelo el fragmento de 78 pb que contiene RFB1 (Ver *Materiales y Métodos*).

### 1.1. OPTIMIZACIÓN DE LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO Rfb1p-DNA *IN VITRO* Y SU DISOCIACIÓN

Previamente se optimizaron las condiciones de unión del complejo Rfb1p-DNA así como de disociación del complejo una vez formado.

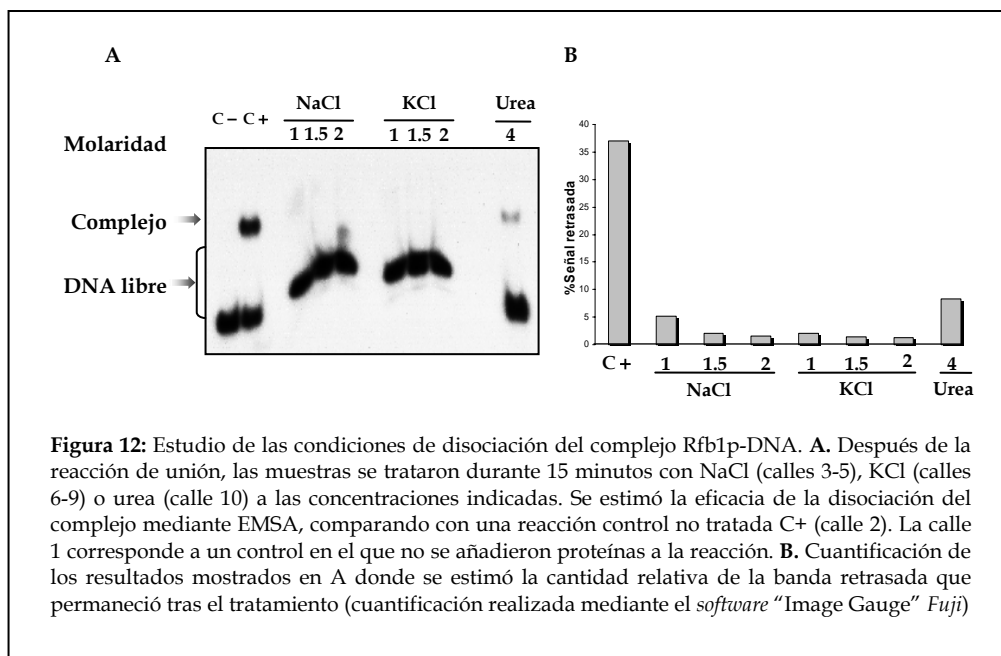
La afinidad de una proteína al DNA viene determinada en gran medida por la fuerza iónica del tampón en el que se realiza la reacción de unión. Otro factor importante es el requerimiento de cationes divalentes de algunas proteínas (ejemplo: Moll y col., 2002) para su unión al DNA. La evaluación de estos factores se llevó a cabo mediante ensayos EMSA tras reacciones de unión empleando concentraciones decrecientes de KCl, desde 0,81 M hasta 0,034 M frente a un extracto proteico total procedente de una estirpe silvestre en presencia de 5 mM de MgCl<sub>2</sub>. En la Figura 11 se puede observar la aparición de dos complejos DNA-proteína de distinta movilidad electroforética. La banda de menor movilidad prácticamente desapareció usando 0,034 M de KCl. Por el contrario, el complejo de mayor movilidad aumentó su intensidad conforme se disminuía la concentración de KCl. (Figura 11, calles 1-6).



Por otro lado, en ausencia de  $Mg^{2+}$  y añadiendo EDTA en el tampón se observó sólo el complejo de menor movilidad, con lo que se aseguraba que en estas condiciones se iba a formar un único complejo DNA-proteína (Fig.11, calle 7). Esto suponía una ventaja puesto que la adición de EDTA dificultaría la unión inespecífica de secuencia de factores generales de unión a DNA que requieren estos iones divalentes (Imbalzano y col., 1994), así como la actividad DNAsa que pudiera estar presente en el extracto y que podría degradar la secuencia de DNA usada como señuelo.

Tras estos resultados, se decidió utilizar en el ensayo de unión un tampón con la fuerza iónica proporcionada por KCl a una concentración de 34 mM y en ausencia de iones  $Mg^{2+}$  por la adición de EDTA a una concentración de 10 mM. Estas condiciones son las que se han descrito con detalle en el apartado de *Materiales y Métodos*.

Seguidamente, se estudiaron distintas condiciones de disociación del complejo Rfb1p-DNA una vez formado, con objeto de maximizar la cantidad de Rfb1p obtenida durante su purificación.



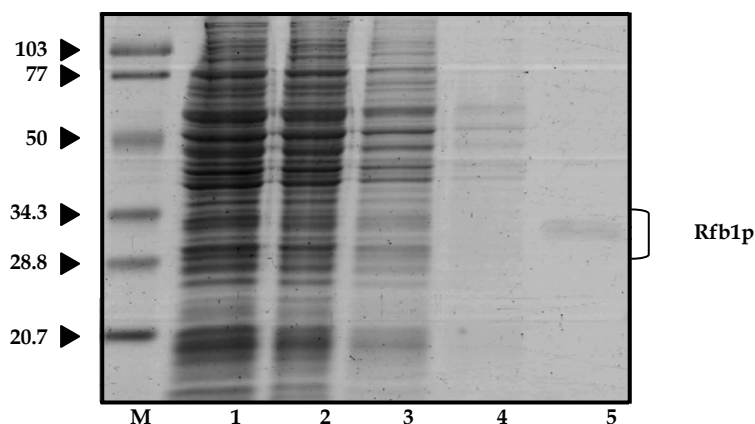
Tras realizar el ensayo de unión como se acaba de describir, las muestras fueron incubadas durante 15 minutos en un tampón de alta fuerza iónica conteniendo NaCl o KCl (1 M, 1,5 M y 2 M) o en un tampón que contenía urea 4 M. A continuación, la eficacia de la disociación del complejo se comprobó mediante EMSA (Figura 12).

Como se observa en la figura, la banda correspondiente al complejo Rfb1p-DNA disminuyó en todos los casos hasta casi desaparecer (Figura 12A, calles 3 a 10), comparados con la reacción control no tratada (calle 2). Es decir, la mayor parte de la proteína se disoció del DNA bajo todas las condiciones ensayadas, si bien, la urea fue la que se mostró menos eficaz (Figura 12A, calle 10 y Figura 12B). Puesto que el KCl a 1M fue algo más eficaz en la disociación del complejo que el NaCl (Figura 12B), se eligió para la elución de Rfb1p en el último paso de la purificación.

## 1.2. PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA Rfb1p DE *S. pombe*

El proceso de purificación se realizó en varios tubos independientes escalando las condiciones establecidas en el apartado anterior usando un extracto proteico de la estirpe S35 de *S. pombe* (apartado 2.6.5. de *Materiales y Métodos*).

Tras el proceso de purificación se detectaron tres bandas muy próximas entre sí, visibles en un gel SDS-PAGE (Figura 13). Las bandas fueron analizadas por separado por el servicio de proteómica del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” mediante espectrometría de masas. Las tres bandas correspondieron a la misma proteína que resultó ser Sap1p (*Switch Activating Protein*). La diferencia de movilidad de las tres bandas podría corresponder a alguna modificación como, por ejemplo, fosforilación, que afectaría a la movilidad electroforética de la proteína. Este resultado es consistente con el mostrado en la Figura 11, en la que se observa un complejo DNA-proteína de intensidad más débil, de movilidad ligeramente menor a la del complejo más intenso, que podría ser debido a la unión de la proteína modificada al DNA.

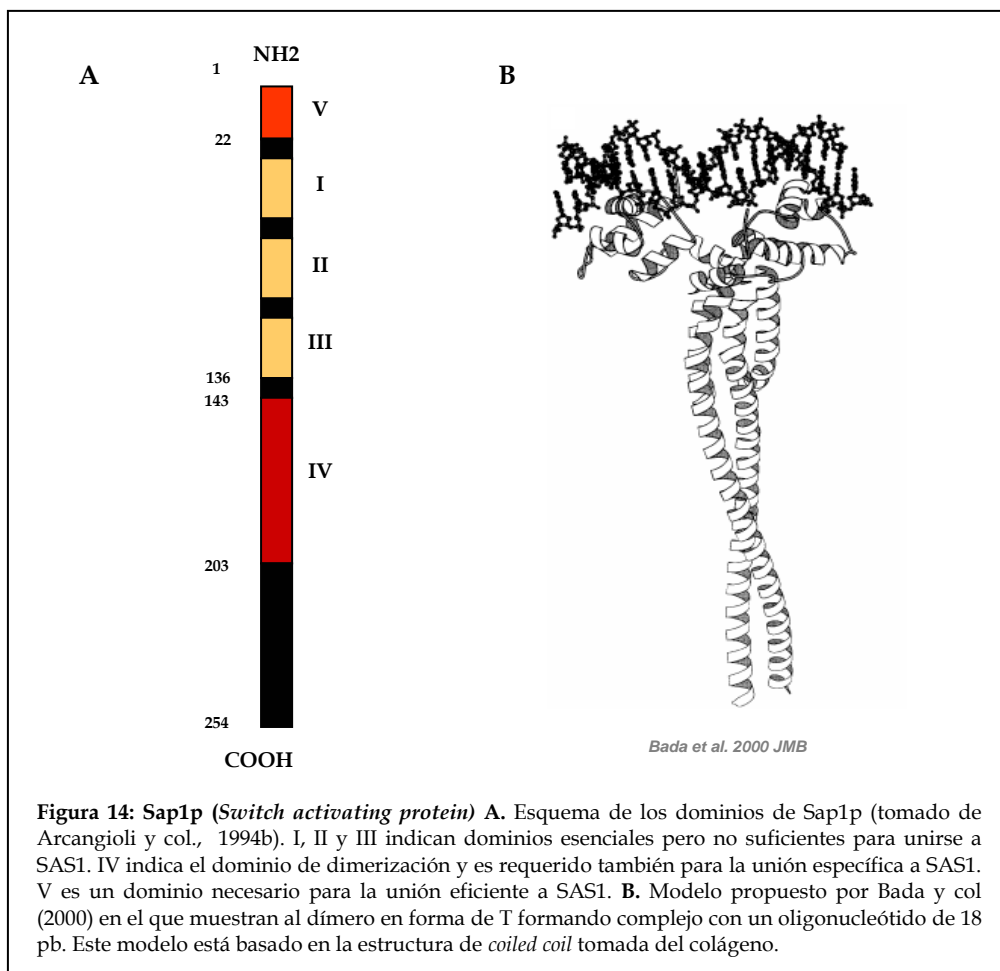


**Figura 13:** SDS-PAGE al 12 % de las proteínas a lo largo del proceso de purificación de Rfb1p teñido con azul de *coomassie*. **Calle 1:** extracto completo; **calle 2:** mismo extracto después de su pase; por la columna de afinidad; **calles 3y 4:** proteínas procedentes de dos lavados sucesivos; **calle 5:** proteína eluída con 1 M de KCl. **M:** marcador de peso molecular (*low range*, BIO-RAD)

### 1.2.1. Sap1p: “Switch Activating Protein”

Sap1p es una proteína de 29 kDa que fue descrita por Arcangioli y Klar en 1991. Es una proteína esencial y necesaria para un eficaz cambio del tipo de apareamiento (Arcangioli y col., 1994a) (Figura 14). Sap1p se une *in vitro* a una secuencia de DNA denominada SAS1, localizada en el *locus mat1* del tipo de apareamiento en el cromosoma II (Figura 4, Introducción) (Arcangioli y col., 1991; Arcangioli y col., 1994a). Sap1p forma dímeros en solución a través de un gran dominio  $\alpha$ -hélice mediante el que se reconocen los monómeros (Bada y col., 2000). La función que se le ha atribuido es la de promover el cambio del tipo de apareamiento y parece que la ejerce a través de su unión a SAS1 (Arcangioli y col., 1994a), ya que este cambio del tipo de apareamiento se ve afectado en ausencia de esta secuencia (mutación *smt-0*) aunque la viabilidad celular no se ve afectada (Styrkarsdottir y col., 1993). Esto demuestra que la esencialidad de Sap1p no reside en su función en este *locus mat1*.



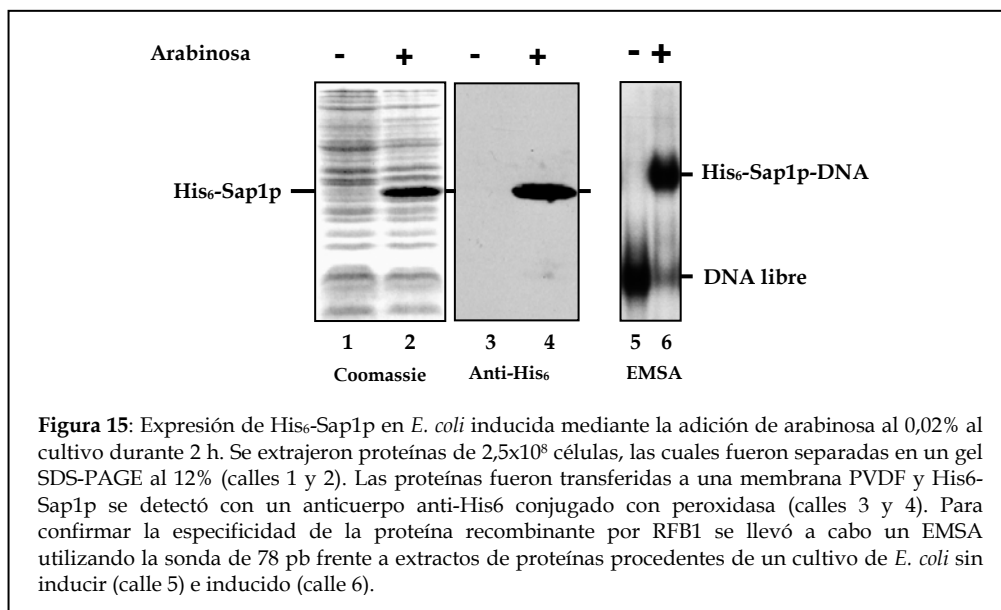


## 2. CONFIRMACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE Sap1p POR RFB1

Para confirmar que la proteína responsable del complejo Rfb1p-RFB1 era Sap1p, se clonó el gen *sap1*<sup>+</sup> en el vector de expresión para *E. coli* pBAD24 inducible por arabinosa. Además se añadieron seis residuos de histidina en el extremo amino terminal para permitir su detección mediante *western blot* así como su posterior purificación en columna de níquel (Ver *Materiales y Métodos*).

Tras varios ensayos de inducción de la expresión de Sap1p con distintas concentraciones de arabinosa (de 0,004% a 0,2%) y durante distintos tiempos de

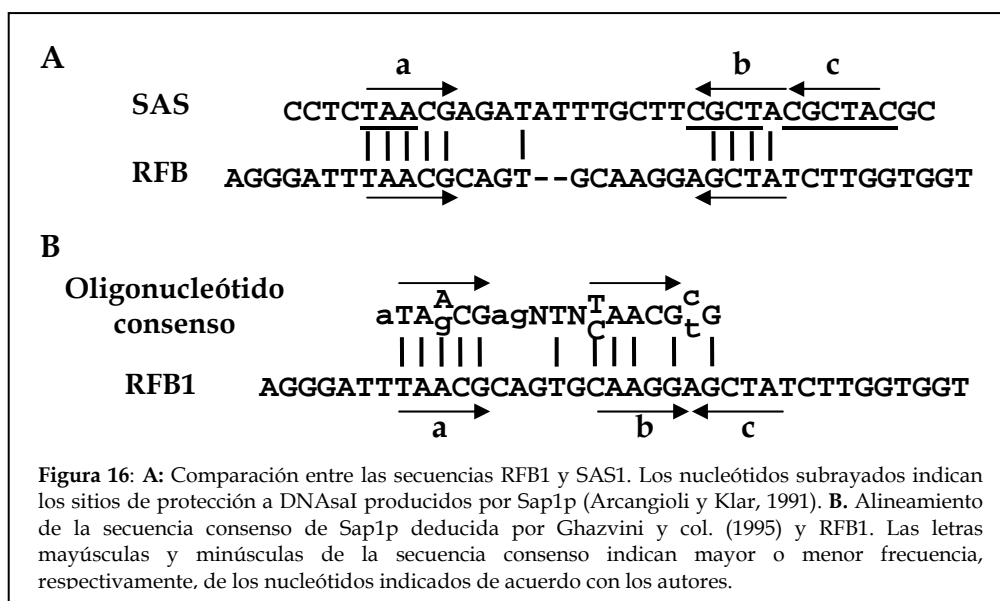
inducción, la expresión óptima se obtuvo a una concentración de arabinosa del 0,02% durante 2 h. En la Figura 15 se muestra la expresión de His<sub>6</sub>-Sap1p en estas condiciones sin y con arabinosa (calles 1 y 2), así como su detección mediante *western* con un anticuerpo anti-His<sub>6</sub> (calles 3 y 4). Para confirmar la especificidad de la proteína recombinante por RFB1 se llevó a cabo un EMSA utilizando la sonda de 78 pb frente a extractos de proteínas procedentes de un cultivo de *E. coli* sin inducir (calle 5) e inducido (calle 6).



La especificidad de la unión de Sap1p por la secuencia RFB1 fue confirmada mediante EMSA usando extractos proteicos procedentes de una estirpe de *E. coli* transformada con pBAD24-His<sub>6</sub>-sap1, en condiciones de represión (Figura 15, calle 5) y de expresión de la proteína (calle 6), frente a la secuencia de 78 pb que contiene la barrera. La proteína recombinante His<sub>6</sub>-Sap1p se unió específicamente a RFB1 ya que sólo se obtuvo la formación del complejo cuando se indujo la expresión del gen *his<sub>6</sub>-sap1*<sup>+</sup>.

### 3. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE UNIÓN DE Sap1p

El análisis de la secuencia nucleotídica de SAS1 mostró que ésta estaba compuesta por tres repeticiones (*a*, *b* y *c*) imperfectas e invertidas, en las que *a* y *b* están separadas por 12 nucleótidos (Arcangioli y col., 1994b; Ghazvini y col., 1995) (Figura 16A). Los sitios de unión de Sap1p a SAS1, caracterizados mediante ensayos de protección a DNAsaI, coincidían con las repeticiones mencionadas anteriormente (Arcangioli y col., 1991).



El alineamiento de las secuencias SAS1 y RFB1 muestra que dos de las repeticiones de SAS1 están presentes también en RFB1, una de ellas sólo con un nucleótido no coincidente (Figura 16A). Ghazvini y col. (1995), mediante el uso de Sap1p recombinante y oligonucleótidos de doble cadena generados al azar, establecieron una secuencia consenso de entre aquellas que eran reconocidas con más afinidad por la proteína (Figura 16B). Esta secuencia está compuesta por dos repeticiones de cinco nucleótidos repetidos separados por otros cinco que actúan como secuencia espaciadora. En dicho espaciador, la cuarta posición está siempre ocupada por una timina. La secuencia RFB1 reúne todas estas características excepto por un nucleótido no coincidente. Teniendo en cuenta

estas consideraciones, la comparación entre SAS1 y RFB1 muestra que ambas secuencias contienen tres repeticiones imperfectas *a*, *b* y *c*, cuya repetición *b* se encuentra en orientación opuesta en una con respecto a la otra. Además, las repeticiones *a* y *b* de RFB1 están espaciadas por cinco nucleótidos, al igual que en la secuencia consenso definida por Ghazvini y col., mientras que en SAS1 están separadas por 12 nucleótidos. En ambos casos, la cuarta posición del espaciador está ocupada por una T (Figura 16). Por lo tanto, RFB1 y SAS1 presentan una gran similitud, aunque muestran diferencias que podrían ser relevantes en la determinación del modo de unión de Sap1p y de su función en cada *locus*.

#### **4. CORRELACION ENTRE LA UNIÓN DE Sap1p A RFB1 Y EL BLOQUEO DE LAS HORQUILLAS DE REPLICACIÓN**

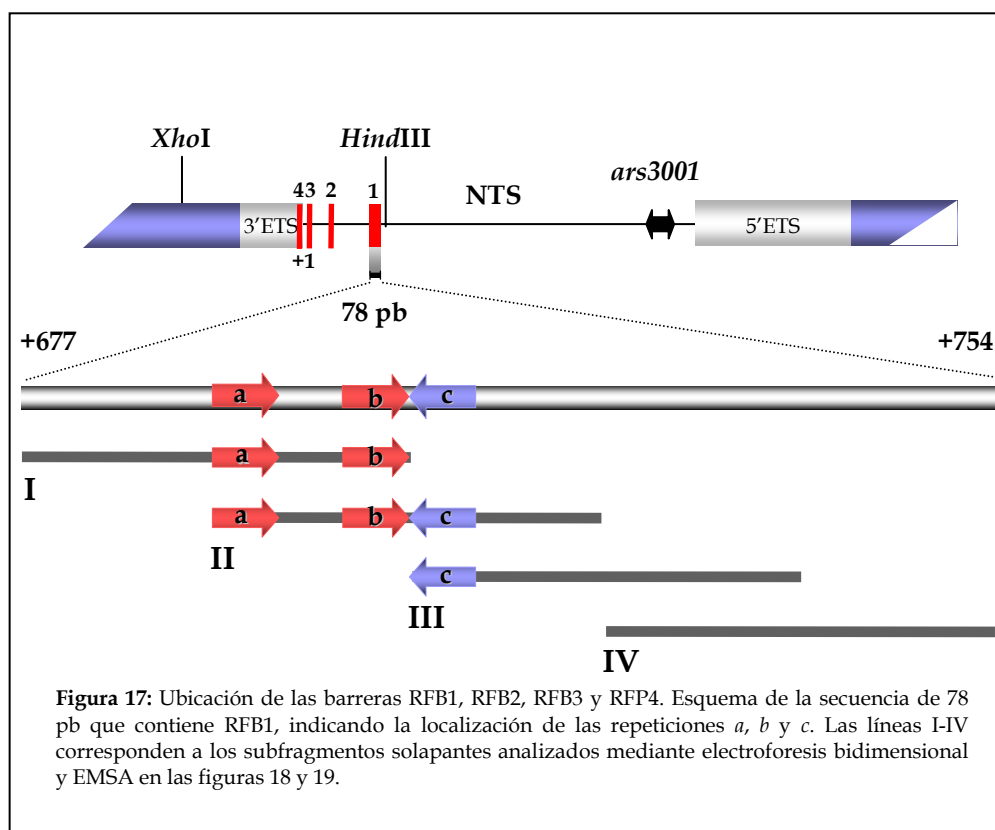
La hipótesis que se plantea en este trabajo es que Sap1p se une a RFB1 y que dicha unión es necesaria para la parada de las horquillas de replicación en RFB1. El hecho de que *sap1<sup>+</sup>* sea un gen esencial no permite el estudio de estirpes mutantes de delección de dicho gen como pudo hacerse con *reb1* y las barreras RFB2 y RFB3 (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004). Como alternativa, se construyeron una serie de mutaciones de RFB1 y estudiamos si, como es de esperar si la hipótesis es correcta, siempre que la mutación impidiera la unión de Sap1p, estudiada mediante EMSA, dicha secuencia se mostraría también incapaz de promover el bloqueo de la horquilla de replicación, ensayado *in vivo* en plásmidos de replicación autónoma.

Con este planteamiento se estudiaron dos grupos de variaciones de RFB1 que se detallan a continuación.

##### **4.1. ESTUDIO DE DELECCIONES SOLAPANTES MEDIANTE GELES BIDIMENSIONALES Y EMSA**

Dado que la secuencia RFB1 de 78 pb contenía las tres repeticiones que, por comparación con SAS1, podrían ser necesarias para la formación del complejo Sap1p-RFB1, estudiamos su relevancia dividiendo la secuencia inicial en cuatro

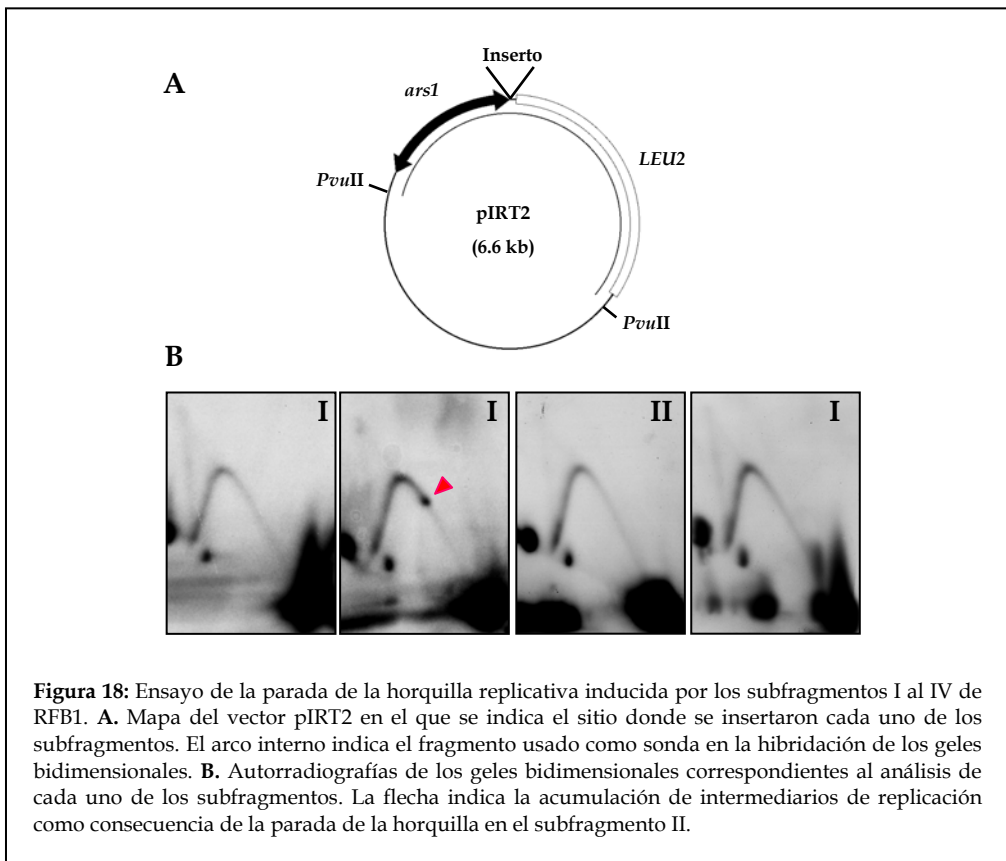
fragmentos solapantes I-IV que contenían, respectivamente sólo dos de las repeticiones (*a* y *b*), las tres (*a*, *b* y *c*), sólo una de ellas (*c*) o ninguna (Figura 17).



Para el análisis del efecto de estas secuencias sobre la progresión de la horquilla replicativa, se clonó cada fragmento en el plásmido de replicación autónoma pIRT2 cerca del origen *ars1*, en aquella orientación en la que son replicadas en el mismo sentido en el que RFB1 detiene a la horquilla en su contexto genómico, es decir, en la orientación potencialmente activa (Figura 18A). Cada uno de estos plásmidos fue usado para transformar la estirpe silvestre S35 y se analizaron los intermediarios de replicación mediante electroforesis bidimensional del fragmento de restricción *PvuII* (Figura 18).

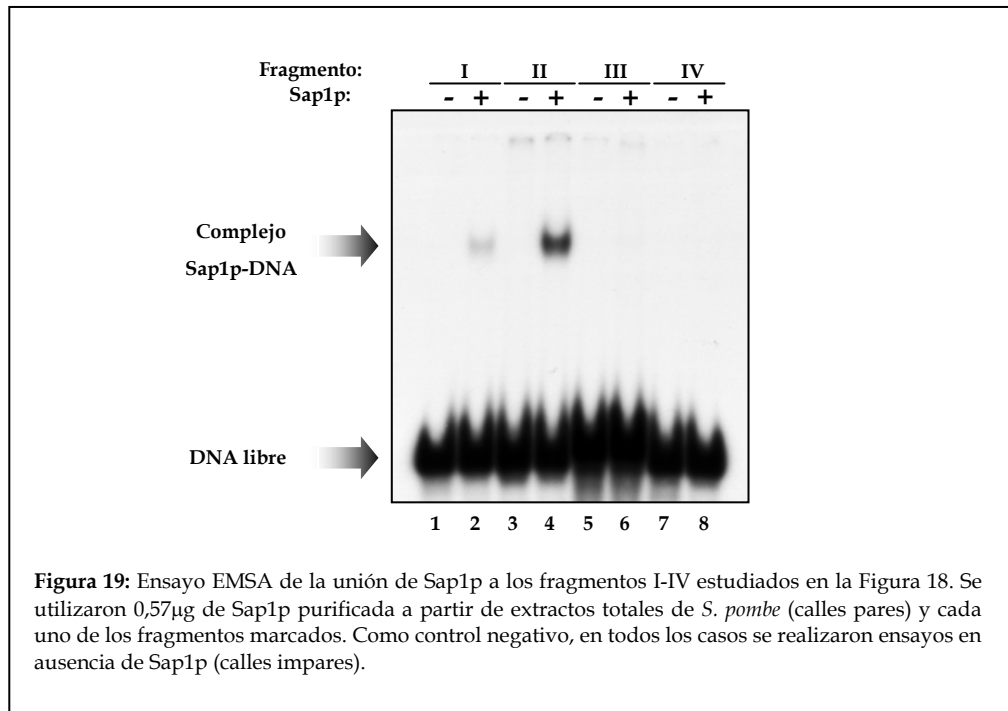
Como se puede observar en la Figura 18B, sólo el fragmento II, que contenía las tres repeticiones, provocó la parada de la horquilla, como indica la acumulación de intermediarios de replicación en la parte ascendente del arco de

Y (flecha). La posición en el arco de esta señal se corresponde con la localización de la secuencia II dentro del fragmento *PvuII* analizado. El análisis de la replicación de los fragmentos I, III y IV dio como resultado un arco de Y sin acumulación de intermediarios en el lugar que corresponde al fragmento en estudio. Estos resultados sugerían que se requieren las tres repeticiones *a*, *b* y *c* para que RFB1 sea funcional y que las 30 pb del fragmento II son suficientes para esa función.



Con objeto de comprobar si existía una correlación entre la capacidad de los fragmentos I al IV para detener a la horquilla y la unión de Sap1p a dichas secuencias, se realizaron ensayos EMSA usando cada uno de estos fragmentos y Sap1p purificada de extractos totales de *S. pombe*.

En la Figura 19 se puede observar que Sap1p se unió con alta afinidad solamente al fragmento II (calle 4), aquél que contenía las tres repeticiones y el único que fue capaz de detener la progresión de la horquilla.

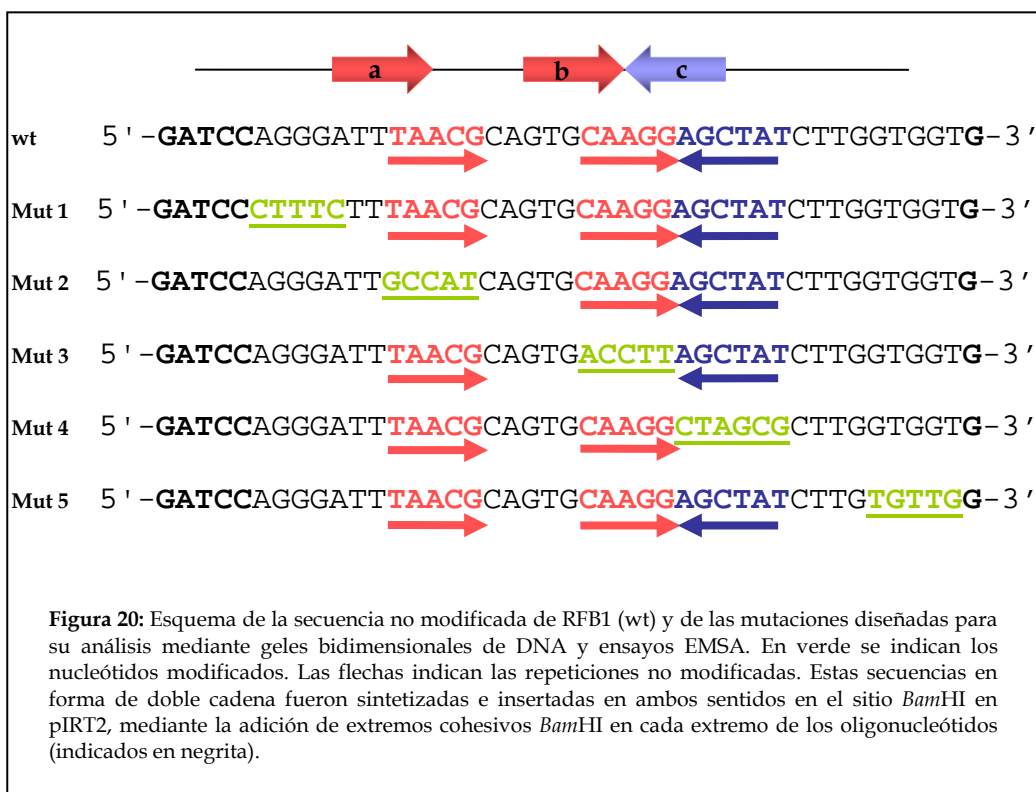


Sap1p también mostró cierta afinidad, aunque mucho más débil, por el fragmento I, que contiene sólo las repeticiones *a* y *b*. Este resultado indicaba que la parada de la horquilla en RFB1 requiere la unión de Sap1p al DNA, probablemente a través de las repeticiones *a*, *b* y *c*.

#### 4.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA MUTACIÓN DE CADA REPETICIÓN DE RFB1

Para determinar la importancia de cada una de las repeticiones presentes en RFB1 para su función como barrera y comprobar si esta función requiere la

formación del complejo Sap1p-RFB1, se utilizó la misma estrategia anterior. Las mutaciones consistieron en el reemplazo de los nucleótidos de cada una de las repeticiones por otras del modo menos conservativo: las adeninas fueron reemplazadas por citosinas, las guaninas por timinas y viceversa (Figura 20). Además, se diseñaron también mutaciones de secuencias externas localizadas a ambos lados del grupo de repeticiones.

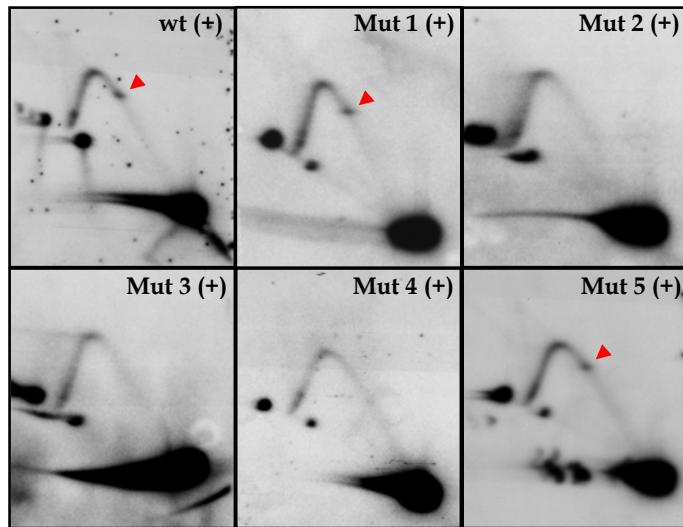


Igual que en el apartado anterior, cada una de estas secuencias mutadas fue insertada en pIRT2 en ambas orientaciones para analizar la replicación de los plásmidos resultantes mediante electroforesis bidimensional.

Como se puede observar en las Figura 21, la mutación de cualquiera de las repeticiones supuso la pérdida de la función RFB1 (paneles Mut 2, Mut 3 y Mut



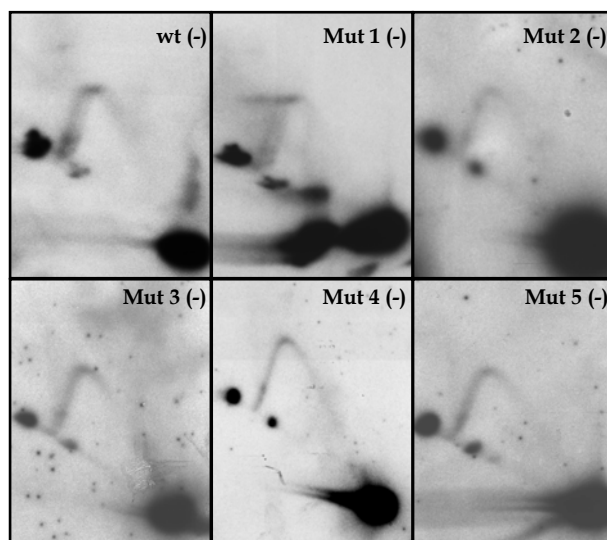
4), mientras que las mutaciones externas que no afectaban a las repeticiones seguían siendo activas (paneles Mut 1 y Mut 5).



**Figura 21:** Análisis de los intermediarios de replicación de la secuencia original de RFB1 (wt) y de sus mutaciones Mut1-Mut5 en sentido (+). Se analizó el fragmento *PvuII* de los plásmidos indicados y se utilizó como sonda el mismo fragmento del plásmido pIRT2. Las flechas indican los intermediarios de replicación acumulados a causa de una barrera activa.

Ninguna de estas secuencias presentó acumulación alguna de intermediarios de replicación cuando se insertaron en la orientación inactiva (Figura 22).

Estos resultados indican que las tres repeticiones *a*, *b* y *c* de RFB1 son requeridas para la parada de la horquilla de replicación, mientras que las secuencias flanqueantes a las repeticiones no son necesarias.



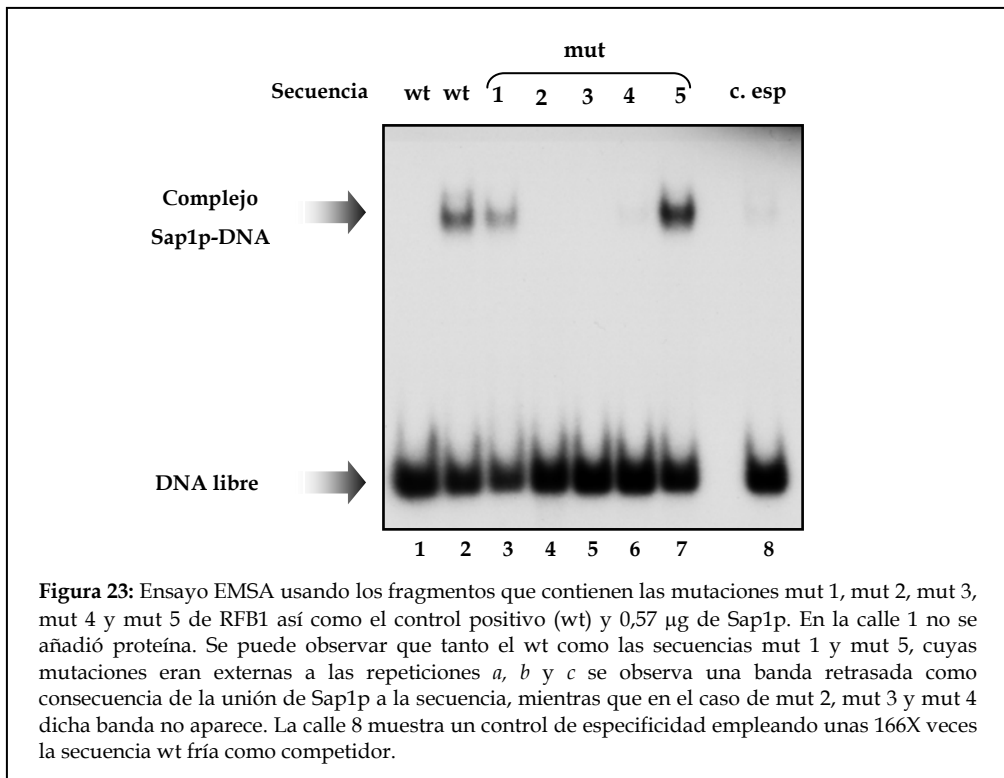
**Figura 22:** Análisis de los intermediarios de recombinación de la secuencia original de RFB1 (wt) y de sus mutaciones Mut1-Mut5 en sentido (-). Se analizó el fragmento *PvuII* de los plásmidos indicados y se utilizó como sonda el mismo fragmento del plásmido pIRT2. Ninguna de las secuencias analizadas en sentido (-) fue capaz de acumular intermediarios de recombinación.

El estudio mediante ensayos EMSA de la capacidad de unión de Sap1p a estas secuencias demostró de nuevo una correlación entre esta unión y la parada de la horquilla de replicación.

Como se observa en la Figura 23, la mutación de cualquiera de las repeticiones provocaba la desaparición de la banda retrasada (calles 4, 5 y 6), no así en el caso de las mutaciones en las secuencias flanqueantes Mut 1 y Mut 5 (calles 3 y 7), lo que indica la necesidad de la presencia de las tres repeticiones para que Sap1p pueda reconocer la secuencia y unirse a ella. En Mut 4, donde la repetición *c* ha sido mutada, se observa una señal muy débil (calle 6), lo cual es consistente con la débil señal retrasada que se obtuvo sobre el fragmento I (Figura 19, calle 2), el cual carecía de la repetición *c*.

Todos estos resultados permiten concluir que las repeticiones descritas, presentes en RFB1, son imprescindibles para el bloqueo de la horquilla de

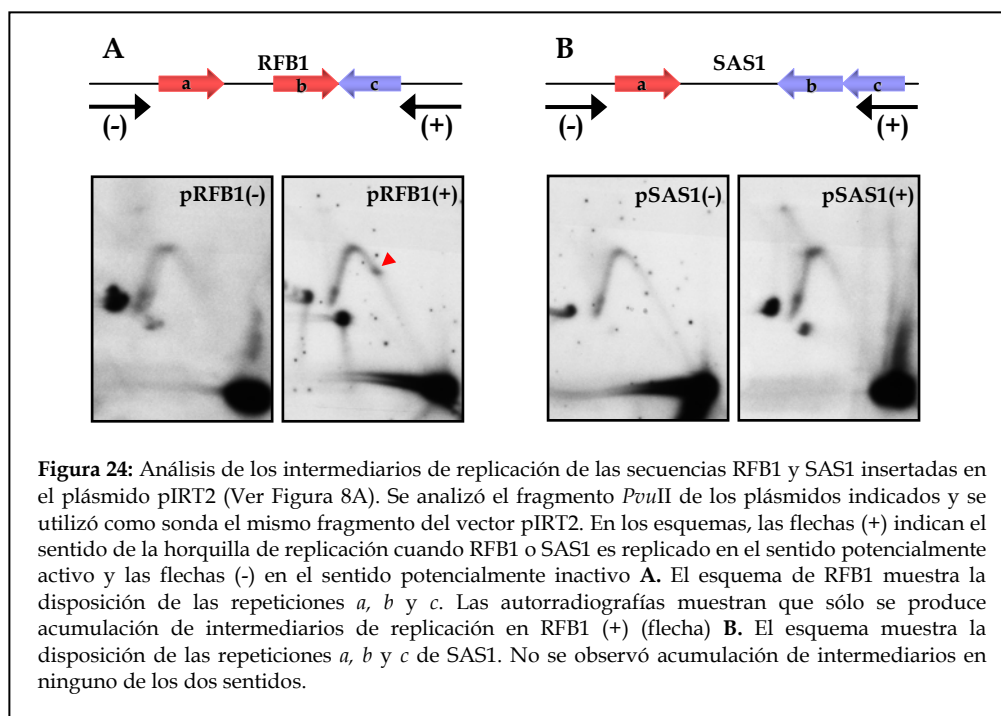
replicación del rDNA y que este bloqueo ocurre a través de la unión del rDNA a la proteína Sap1.



## 5. ANÁLISIS DE LA REPLICACIÓN DE LAS SECUENCIA SAS1 Y RFB1

Como se ha mencionado en la introducción, en la zona 3' del *locus mat1* existe un sitio de pausa para la horquilla de replicación que se mueve hacia *mat1* denominado MPS1 (Dalgaard y Klar, 2000). Se ha propuesto que esta pausa MPS1 está causada por la propia "huella", necesaria para el cambio del tipo de apareamiento, y que la rotura de la horquilla detenida promovería la recombinación con el *locus* silenciado y la conversión génica. SAS1, la secuencia de unión de la proteína Sap1, está localizada a 134 pb en 3' de MPS1. Dalgaard y Klar (2000) comprobaron que en una estirpe en la que se ha producido la deleción *smt-0* (Styrkarsdottir y col., 1993) que incluye SAS1, se seguía observando en geles bidimensionales una acumulación de horquillas detenidas en la zona, de lo que podría concluirse que SAS1 no provoca parada de las

horquillas de replicación. Esta aparente discrepancia entre el efecto de SAS1 y RFB1 sobre la replicación, podría deberse a que, a consecuencia de las diferencias de secuencia de estos dos sitios, el modo de unión de Sap1p a cada uno de ellos fuera distinto y esto causara un cambio de la polaridad con que cada secuencia inhibe el progreso de las horquillas. Por esa razón se decidió clonar la secuencia SAS1 en pIRT2 para estudiar el avance de la horquilla en ambos sentidos. Como control se estudió también la replicación de RFB1.



Como era de esperar, RFB1 se comportó como una barrera polar que impide el avance de la horquilla cuando se inserta en el plásmido en la orientación activa (Figura 24A, pRFB1+) sin efecto cuando el sentido de la replicación es el contrario (Figura 24A, pRFB1-). Sin embargo, SAS1 no indujo la acumulación de intermediarios de replicación en ninguno de los dos sentidos (Figura 24B).

Estos resultados parecen indicar que el efecto que Sap1p ejerce en estos dos *loci* sobre la horquilla de replicación es diferente. En el rDNA Sap1p es capaz de detener la horquilla, mientras que en el *locus* del tipo de apareamiento no

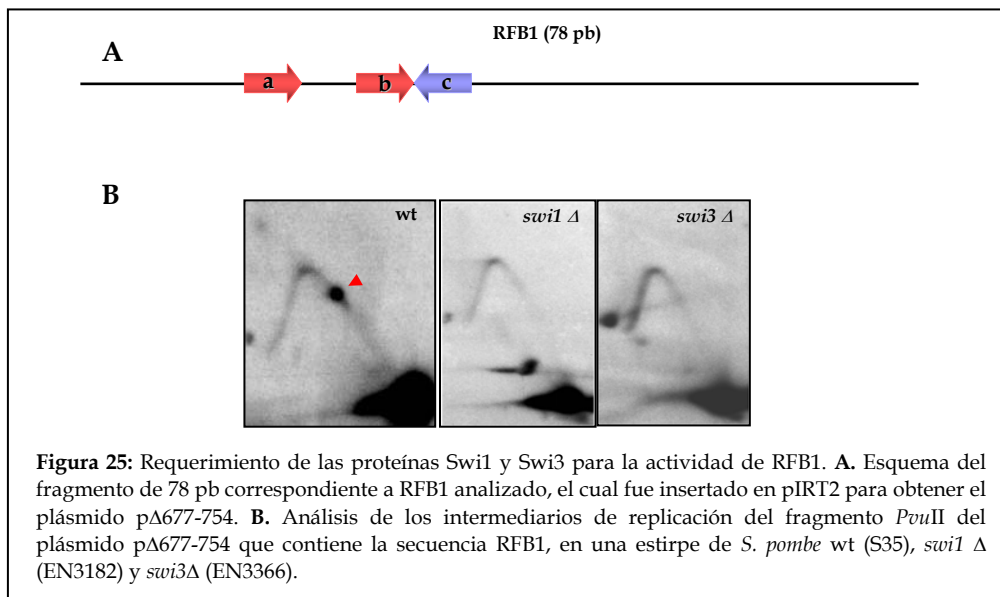
afectaría al avance de la maquinaria replicativa. Esta diferencia podría deberse a la distinta disposición de las repeticiones en RFB1 y SAS1, lo que determinaría modos diferentes de unión de Sap1p al DNA en cada *locus*.

## 6. ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN RFB1 EN ESTIRPES *swi1Δ* Y *swi3Δ*

Los dos sitios naturales de parada de las horquillas de replicación presentes en el *locus mat1* de *S. pombe* requieren las proteínas Swi1 y Swi3 (Dalgaard y Klar 2000). Estas dos proteínas parecen actuar conjuntamente como un heterodímero habiéndose propuesto que forman parte de un complejo general de estabilización de horquillas detenidas y que son necesarias para el *checkpoint* en fas S que detiene la división celular como respuesta a la presencia de estas horquillas detenidas (Noguchi y col., 2004).

Con objeto de conocer si Swi1p y Swi3p están también relacionadas con la parada de horquillas en la barrera RFB1 del rDNA se analizó la replicación del plásmido pΔ677-754, que lleva los 78 pb correspondientes a RFB1, introducido en las estirpes *swi1Δ* (EN3366) y *swi3Δ* (EN3182), cedidas por el doctor Paul Russell (Noguchi y col., 2004). Como se observa en la Figura 25, en ninguna de las estirpes mutantes se produjo acumulación de intermediarios de replicación, indicando que también en el caso de RFB1, Swi1p y Swi3p son necesarias para la parada de la maquinaria replicativa.

Durante el transcurso de la realización de esta tesis, el grupo de Deepak Bastia comprobó que estas dos proteínas también se requieren para la actividad de las otras dos barreras del rDNA de *S. pombe*, RFB2 y RFB3 (Krings y Bastia, 2004).



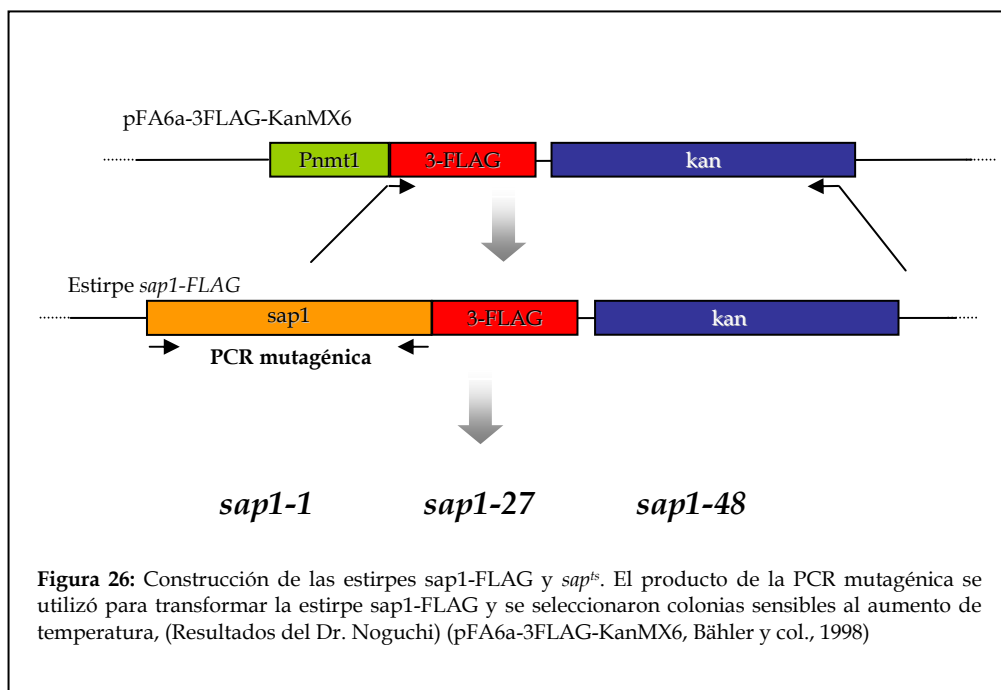
## 7. ANÁLISIS DE MUTANTES TERMOSENSIBLES *sap1<sup>ts</sup>*

Como se ha comentado anteriormente, Sap1p es una proteína esencial (Arcangioli y col., 1991).

Uno de los objetivos de esta tesis era generar estirpes mutantes condicionales para el gen *sap1<sup>+</sup>* para estudiar el requerimiento de este gen en la función de RFB1 y su posible relación entre el papel de Sap1p en el rDNA y su naturaleza esencial.

Sin embargo, el Dr. Noguchi (Drexler University) nos ofreció la posibilidad de emplear tres estirpes *sap1<sup>ts</sup>* construidas en su laboratorio dentro de una colaboración entre los dos grupos.

Estas estirpes fueron generadas a partir de otra a la que previamente *sap1<sup>+</sup>* había sido etiquetada con tres repeticiones del péptido FLAG (estirpe *sap1-FLAG*) (Figura 26). Para la obtención de las estirpes termosensibles, el gen *sap1<sup>+</sup>* endógeno fue sustituido por los productos de PCR mutagénicas generados con el DNA de la estirpe *sap1-FLAG*, aislándose tres estirpes termosensibles (*sap1-1*, *sap1-27* y *sap1-48*, Figura 26).

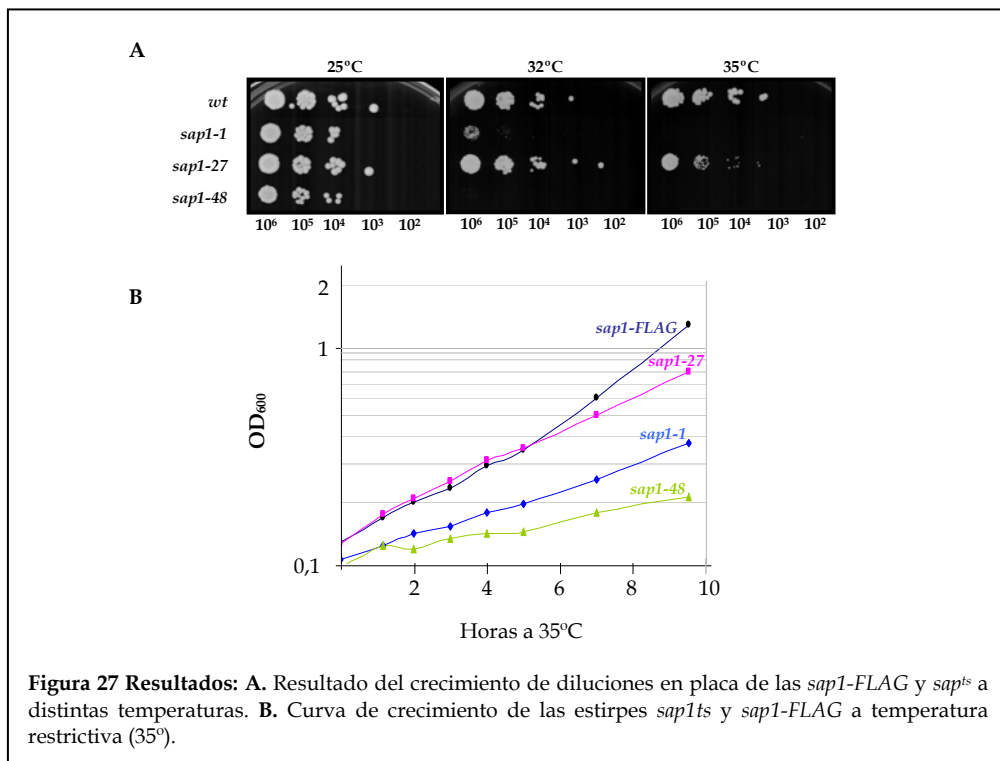


## 7.1. ESTUDIO DEL FENOTIPO DE LAS ESTIRPES *sap1<sup>ts</sup>*

### 7.1.1. CRECIMIENTO

Como se puede observar en la Figura 27A, los mutantes más sensibles al cambio de temperatura fueron *sap1-1* y *sap1-48*.

Los resultados obtenidos en cultivos líquidos fueron similares a estos. Se crecieron cultivos a 25°C hasta una  $OD_{600} \cong 0,1$  y se transfirieron a 35°C, estudiándose el crecimiento de las estirpes mutantes comparados con la *wt* (Figura 27B) a lo largo del tiempo desde el cambio a temperatura restrictiva. De nuevo, la estirpe *sap1-48* fue la más sensible seguida de *sap1-1* y *sap1-27*.

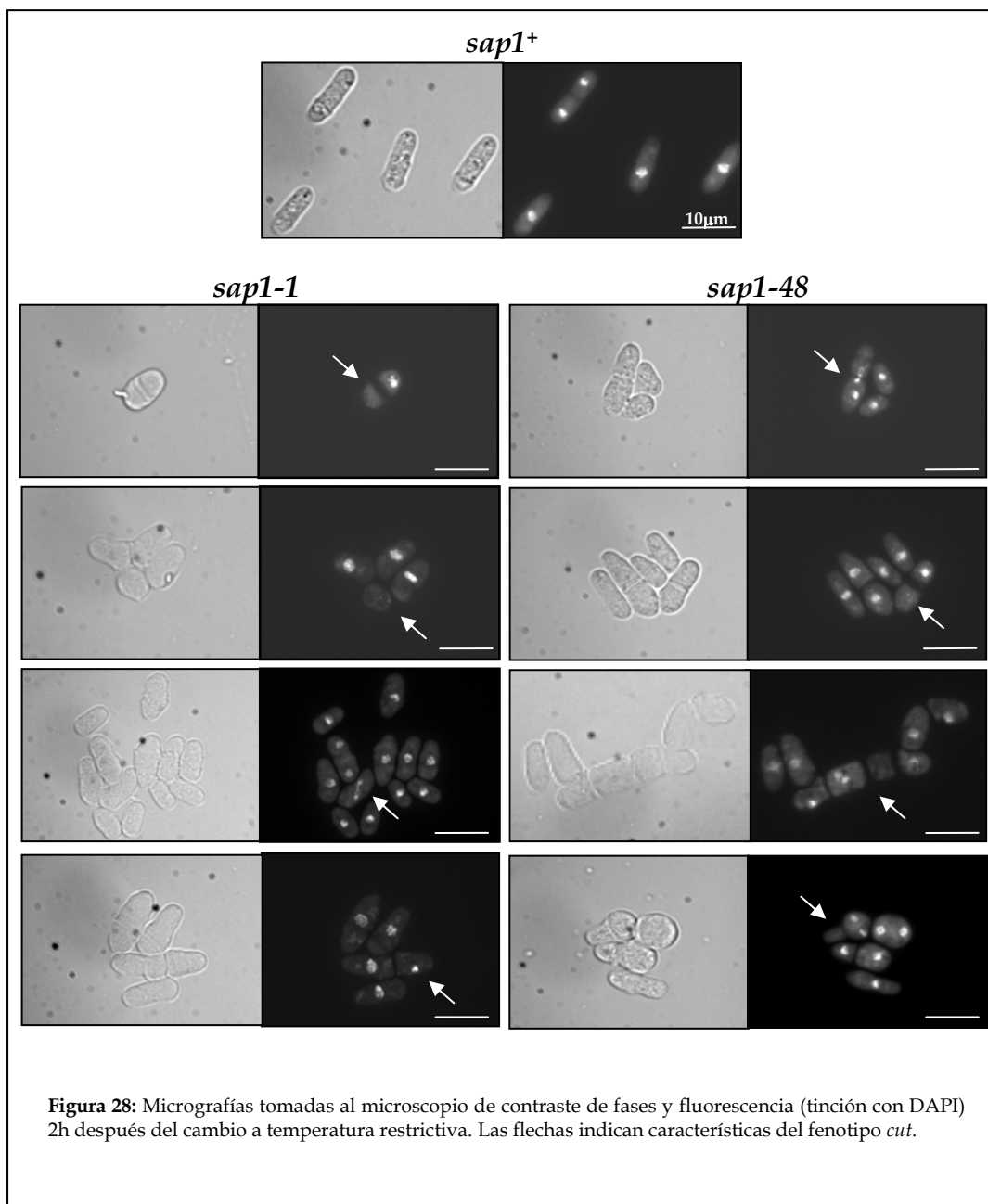


### 7.1.2. TINCIÓN CON DAPI Y OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

Se tomaron muestras de los cultivos de las células *sap1<sup>ts</sup>* 2 h después del paso a temperatura restrictiva, las cuales fueron fijadas, teñidas con DAPI y observadas al microscopio de fluorescencia. Las células de la estirpe *sap1-27* no presentaron ninguna anomalía comparada con las de la estirpe silvestre (Figura 28, *sap1-FLAG*). Sin embargo, un gran número de células de las estirpes *sap1-1* y *sap1-48* habían sufrido la formación del septo y citocinesis en ausencia de división del núcleo, conocido como fenotipo *cut* (Uemura y Yanagida, 1984; Hirano y col., 1986) (Figura 28, *sap1-1* y *sap1-48*). Este fenotipo da lugar a células sin núcleo o con una cantidad muy pequeña de carga de DNA. A parte del fenotipo *cut*, algunas de las células *sap1-1* y *sap1-48* presentaron un aspecto alargado multiseptado y con una carga de DNA anormal. Después de unas 6 h de crecimiento, aumentó el número de células alargadas y con un núcleo



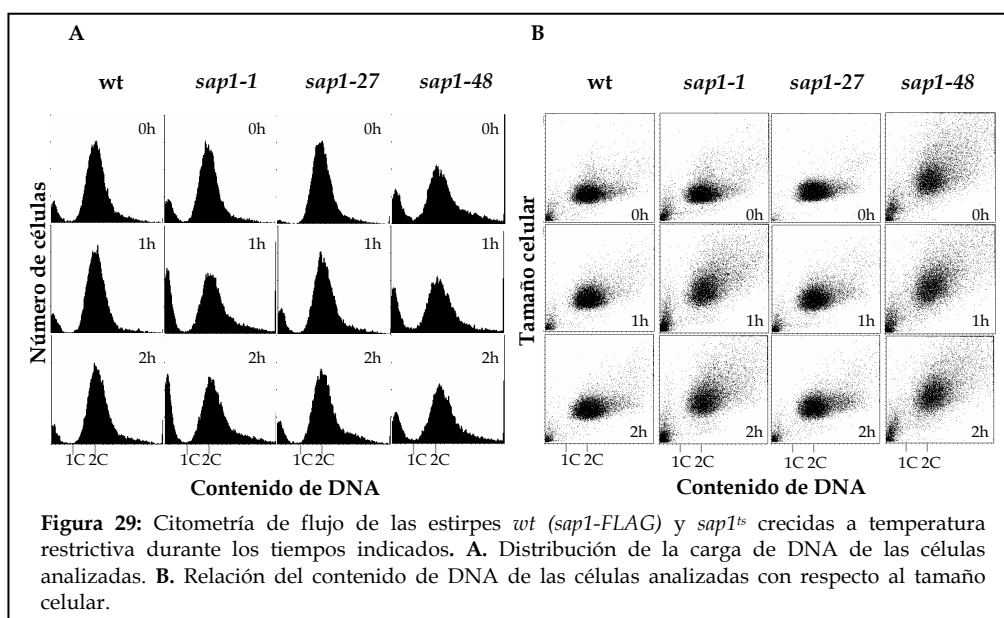
anormal (resultados no mostrados), lo cual es consistente con el aumento de densidad óptica de estas estirpes descrito en el apartado anterior. Este aumento no es debido a la división celular sino al aumento de tamaño de las células y a restos de muerte celular.



### 7.1.3. CITOMETRÍA DE FLUJO DE LAS ESTIRPES *sap1<sup>ts</sup>*

Para obtener información acerca del efecto de la temperatura restrictiva sobre el ciclo celular de las células *sap1<sup>ts</sup>*, se analizó el contenido de DNA y el tamaño celular por citometría de flujo a temperatura permisiva (25°C) y durante las dos primeras horas de crecimiento después de cambiar la temperatura a 35°C.

Como se observa en la Figura 29A, al cabo de 1h y 2h de crecimiento a 35°C, los mutantes *sap1-1* y *sap1-48* presentan una mayor variabilidad de carga de DNA, así como células con un contenido inferior a 1C. Estas células con bajo contenido de DNA podrían corresponder a restos celulares resultado de muerte celular y a células que han sufrido segregación asimétrica como consecuencia de un fenotipo *cut*. También se observó un efecto sobre el tamaño celular, produciéndose, sobre todo en las estirpes *sap1-1* y *sap1-48*, un incremento del mismo y un aumento de la heterogeneidad (Figura 29B).



Estos resultados son coherentes con los obtenidos al estudiar el crecimiento de los mutantes *sap1<sup>ts</sup>*. La estirpe más sensible es *sap1-48* seguida de *sap1-1*. En el caso de *sap1-48*, la alteración del contenido de DNA y del tamaño celular con respecto al control (*wt*) se observan incluso a 25°C (Figura 29, *sap1-48* A y B, 0h).

También las observaciones de las células teñidas con DAPI al microscopio de fluorescencia están en concordancia con los resultados de citometría de flujo, ya que, efectivamente, se observaron células *sap1-1* y *sap1-48* con un bajo o nulo contenido de DNA, así como células de mayor tamaño multiseptadas (Figura 28).

#### 7.1.4. ESTUDIO DE LA REPLICACIÓN DEL LOCUS DEL rDNA EN *sap1<sup>ts</sup>*

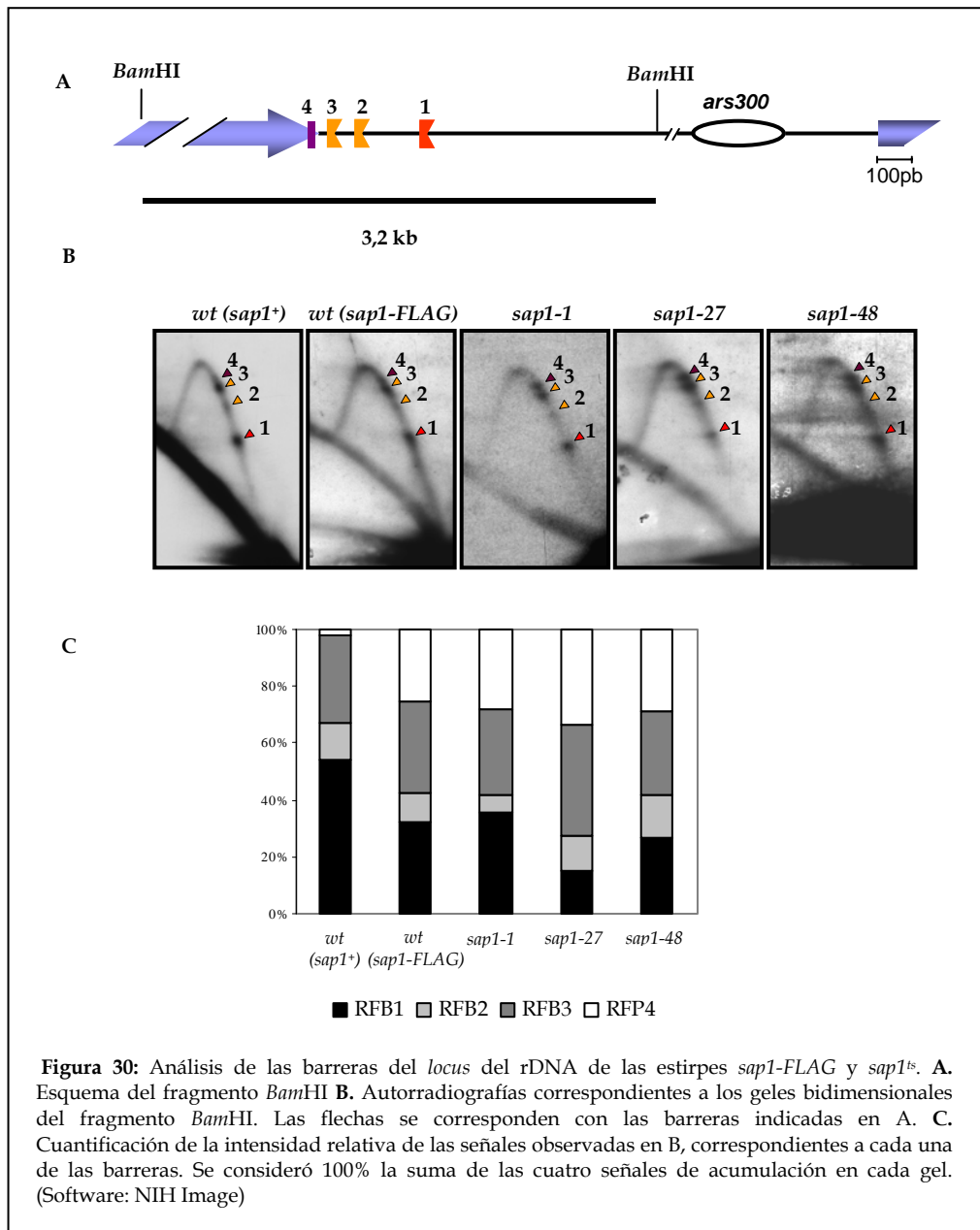
Para comprobar la funcionalidad de las barreras del rDNA en los mutantes *sap1<sup>ts</sup>* se analizó la replicación de la región de las barreras del locus ribosómico mediante electroforesis bidimensionales de DNA. Nuestro objetivo era detectar posibles variaciones en la actividad de RFB1 en relación con la del resto de las barreras.

Se extrajo DNA replicativo de cultivos exponenciales de cada uno de los tres mutantes, así como de las estirpes *sap1-FLAG* y de una estirpe silvestre *sap1<sup>+</sup>*, crecidos a 25°C, siendo digerido seguidamente con la enzima *Bam*HI para generar fragmento de 3,2 kb que contiene las cuatro barreras presentes en el rDNA (Figura 30A).

La figura 30B y C muestran los resultados de los geles bidimensionales tras la hibridación. Se pueden observar las señales correspondientes a las tres barreras descritas para el rDNA de *S. pombe* RFB1, RFB2 y RFB3 (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004) así como la pausa RFP4 (Krings y Bastia, 2004). En la estirpe *wt* (*sap1<sup>+</sup>*), la barrera más eficiente es RFB1, ya que la señal correspondiente a sus intermediarios acumulados es más intensa, mientras que la menos eficiente es RFP4.

La adición de las tres etiquetas FLAG en la estirpe *sap1-FLAG* ya generó una disminución de la eficacia relativa de RFB1 y un incremento importante del

último de los sitios de parada RFP4 (Figura 30C), que es independiente de Reb1p y del complejo Swi1p-Swi3p (Krings y Bastia, 2004) y cuya naturaleza aún se desconoce. En el mutante *sap1-48* y, sobre todo, en el *sap1-27*, se produjo una disminución adicional de la función de RFB1 hasta menos de la mitad de la observada en la estirpe *sap1-FLAG*.



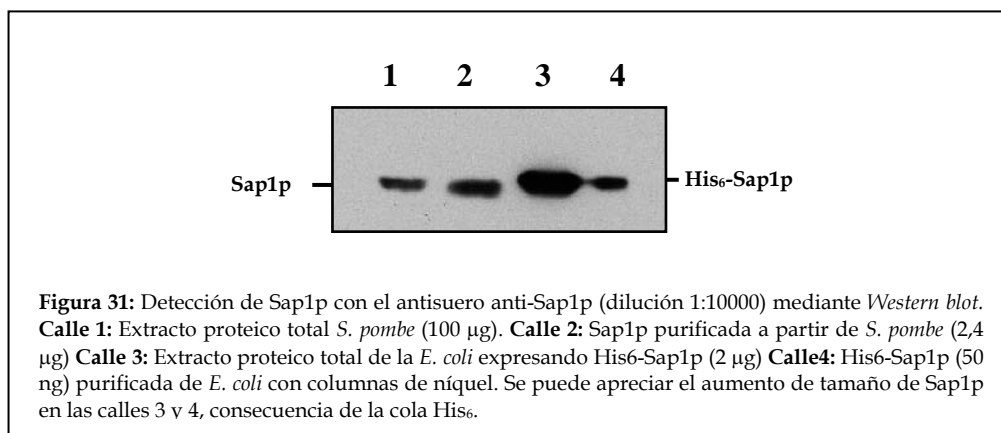
## 8. LOCALIZACIÓN CELULAR DE Sap1p

Lahondès y col (2003) expresaron en *E. coli* la proteína truncada Sap1 1-203) que contenía los dominios esenciales para la unión a DNA (I, II, III y V) así como el dominio de dimerización (IV) (Arcangioli y col., 1994b) con el objeto de generar un anticuerpo. Con dicho anticuerpo realizaron ensayos inmunocitoquímicos en los que observaron que Sap1p presentaba una localización nuclear que parecía no variar en las distintas fases del ciclo celular.

Durante el desarrollo de esta tesis se ha generado un anticuerpo policlonal anti-Sap1p que se ha utilizado tanto en ensayos de *western blot* como para estudiar la localización intracelular de la proteína.

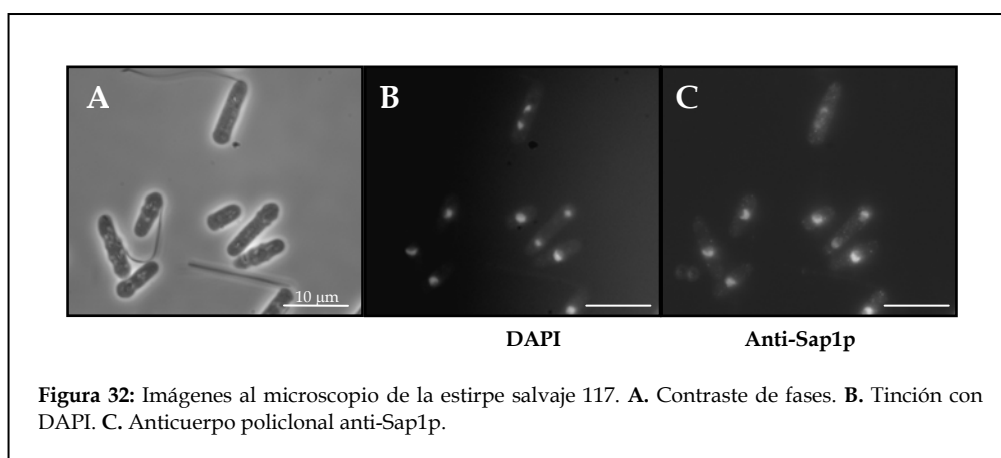
La proteína recombinante His<sub>6</sub>-Sap1 expresada en *E. coli* fue purificada en columnas de níquel (apartado 2.4.3., Materiales y Métodos) e inyectada en conejos para obtener un suero policlonal anti-Sap1p (apartado 2.6.6., *Materiales y Métodos*).

Para comprobar la especificidad del anticuerpo para reconocer Sap1p se realizaron diversos *western blots* utilizando distintas diluciones de anticuerpo. En la Figura 31 se muestra que el anticuerpo (a una dilución 1:10000) reconoce la proteína endógena de *S. pombe* tanto en un extracto total (calle 1) como la purificada por afinidad (apartado 1.3) (calle 2).



Dada la alta afinidad con la que el anticuerpo fue capaz de reconocer Sap1p endógena en *western blot*, utilizamos ese mismo suero para llevar a cabo un ensayo de inmunocitoquímica.

En la Figura 32 se muestran células de una estirpe silvestre *sap1*<sup>+</sup> de *S. pombe* (117) fijadas y sometidas a la detección inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-Sap1p y a tinción DAPI. La imagen obtenida en ambos casos fue muy similar, observándose la tinción característica del núcleo en forma de media luna, lo que indica una localización nuclear de Sap1p sin una aparente acumulación en el nucleolo.



## 9. EFECTO DE LA ELIMINACIÓN DE LOS 40 AMINOÁCIDOS DEL EXTREMO CARBOXILO DE Sap1p EN LA VIABILIDAD CELULAR

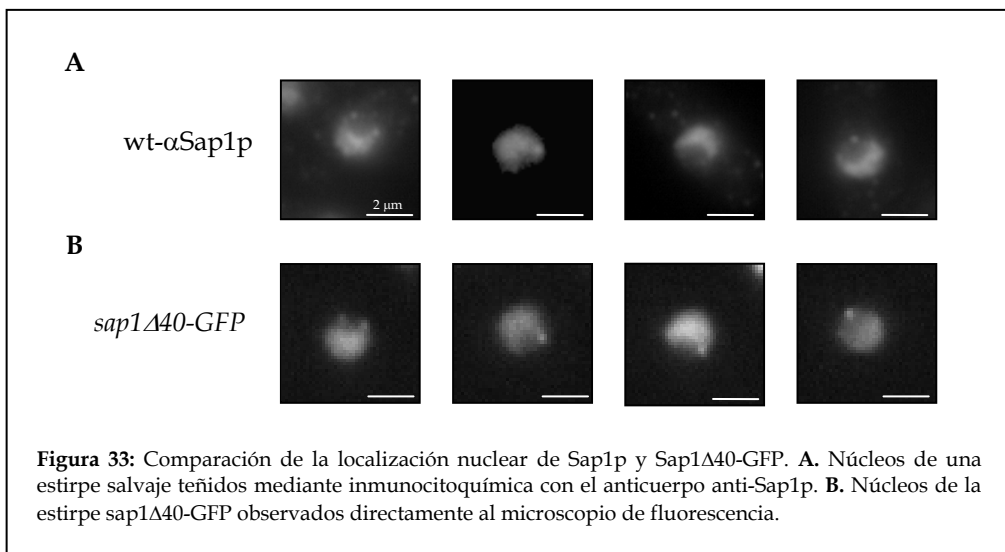
Como se ha mencionado a lo largo de esta tesis, las funciones que se han descrito para Sap1p hasta el momento, en el cambio de tipo de apareamiento y en el bloqueo de las horquillas de replicación del rDNA, no parecen ser las responsables de su esencialidad.

Sap1p es una proteína cuya estructura primaria no tiene homología significativa con ninguna otra proteína de *S. pombe* ni de otros organismos.

Según Bada y col. (2000), Sap1p es una molécula con dos módulos distanciados 12 nm por una zona de dimerización *coiled coil*. El dominio N-terminal constituiría el módulo de unión a DNA. Por su parte, el dominio C-terminal contiene cuatro repeticiones del tetrapéptido MG(T/A)N, que también

está presente en proteínas de la familia de las calponinas, relacionadas con la formación de redes de actina. Se especula que estas repeticiones otorgarían a Sap1p una función relacionada con el esqueleto nuclear (Bada y col., 2000). Por otro lado, se ha atribuido a este dominio C-terminal una función relacionada con procesos de organización de la cromatina (Lahondes y col., 2003), siendo el extremo N-terminal el que se encargaría de anclarse al DNA. Una de las observaciones de Lahondes y col. (2003) fue que la sobre expresión de los últimos 40 aminoácidos de Sap1p (incluyendo las repeticiones del tetrapéptido) inducen una anafase anormal, así como un fenotipo *cut* asociado al paso de las células por la fase S.

Una de las cuestiones que surgen de estas observaciones es si el extremo C-terminal, que contiene el tetrapéptido repetido, es importante para la función esencial de Sap1p. Para contestar esta pregunta se eliminaron los 40 aminoácidos C-terminales de Sap1p y se comprobó la viabilidad celular. Al mismo tiempo, la proteína truncada se fusionó con GFP para su detección.



Se obtuvieron colonias viables, en las que se confirmó por PCR la delección de los 40 aminoácidos terminales. Esto indica que esta región C-terminal no es necesaria para la función esencial de Sap1p. Como se puede ver en la Figura 33 al igual que la proteína intacta, la proteína truncada tiene una localización nuclear, con lo que la región C-terminal eliminada tampoco es importante para la localización nuclear de Sap1p.



## *DISCUSIÓN*

## 1. Sap1p Y LAS BARRERAS PARA LA REPLICACIÓN EN EL rDNA

Sap1p es una proteína esencial para el crecimiento celular identificada originalmente como una proteína requerida para un eficiente cambio del tipo de apareamiento. Sin embargo, la naturaleza esencial de Sap1p no es atribuible a este papel, ya que la ausencia en dicho *locus* de la secuencia de unión de Sap1p, SAS1, no es deletérea para la célula (Dalgaard y col.,2000).

Los resultados obtenidos en esta tesis son la primera evidencia de un sitio de unión para Sap1p fuera del *locus* del cambio del tipo de apareamiento, el cual se encuentra en la región del rDNA donde se localiza la barrera para la replicación RFB1.

En el rDNA de *S. pombe* existen cuatro barreras (RFB1-3 y RFP4) que detienen las horquillas de replicación que se mueven en contra de la transcripción (Figura 34). RFB2 y RFB3 son dependientes de la proteína terminadora de la transcripción del rRNA Reb1p (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004), mientras que RFP4, descrita recientemente (Krings y Bastia, 2004), no ha sido estudiada aún, aunque es independiente de Reb1p y se ha sugerido que pudiera ser consecuencia de la colisión entre las maquinarias de replicación y transcripción en el rDNA (Krings y col., 2004). Resulta llamativo que las cuatro barreras sean polares y que el mecanismo de parada de la horquilla en cada una de ellas sea distinto, tal y como se deduce del hecho de que intervienen factores diferentes.

En esta tesis se ha demostrado que RFB1, la más potente de las barreras del rDNA y la primera que es alcanzada por la horquilla, requiere la unión de Sap1p. Se ha demostrado también que la secuencia SAS1, a la cual también se une Sap1p, no es capaz de provocar la acumulación de intermediarios de replicación (Figura 24), quizá debido a la distinta disposición de las repeticiones que Sap1p reconoce. Una vez publicados parte de los resultados de esta tesis (Mejía-Ramírez y col., 2005, ver *Anexo*), el grupo de Deepak Bastia confirmó nuestros mismos resultados utilizando técnicas prácticamente idénticas a las empleadas en esta tesis.

Sobre la base de la observación de que Sap1p induce curvatura en el DNA (B. Arcangioli, comunicación personal), recientemente se ha propuesto que la unión de Sap1p al DNA no sería suficiente para detener la maquinaria replicativa, sino la distorsión que Sap1p ocasiona en el DNA. Así no sólo la afinidad, sino también la distorsión ocasionada por Sap1p parece ser distinta sobre RFB1 que sobre SAS1, lo que explicaría la distinta actividad de Sap1p en estos *loci* (Krings y Bastia, 2005 y 2006). Sin embargo, se desconoce qué componentes del replisoma son inhibidos por el complejo RFB1-Sap1p.



Independientemente de los factores y del mecanismo que provocan la parada de las horquillas en el rDNA, a pesar de su redundancia, estas barreras parecen no ser indispensables para la viabilidad celular en *S. pombe*, al menos a corto plazo y en el laboratorio. Esto está apoyado por los resultados obtenidos con mutantes *swi1Δ* o *swi3Δ*, donde la ausencia de barreras en el rDNA no afecta significativamente a la viabilidad celular (Figura 25 de esta tesis, Krings y col., 2005). Además, en *S. cerevisiae*, el gen *FOB1*, requerido para la actividad de las barreras del rDNA, no es un gen esencial (Kobayashi, y col., 1996).

En la figura 34 se resumen los factores en *cis* y en *trans* que se conocen y que están involucrados en las barreras naturales descritas en *S. pombe*. Existen en total seis barreras programadas, cuatro localizadas en el *locus* de los genes rRNA y dos en el *locus* del tipo de apareamiento *mat1*. Como se discute a continuación, el complejo heterodimérico Swi1p-Swi3p está relacionado con todas estas barreras, a excepción de RFP4 (Krings y Bastia, 2004).

Según se mostró en la Figura 25, la acumulación de horquillas detenidas en la secuencia de 78 pb que contiene RFB1 no ocurre en estirpes mutantes *swi1Δ* o *swi3Δ*, lo que indica que se requiere este heterodímero para la actividad de RFB1. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Krings y Bastia (2004), de los que se deducía que el heterodímero Swi1p-Swi3p se requiere para la actividad de las barreras RFB1-3. Sin embargo, el complejo no se asocia directamente al DNA en la zona de las barreras, sino, probablemente, a través de algún otro factor proteico (Krings y Bastia, 2004). Los resultados presentados en esta tesis indican que Sap1p es un factor que se une directamente a la barrera RFB1. Sap1p podría actuar como plataforma para la formación de un complejo del que formarían parte Swi1p y Swi3p. Sin embargo, recientemente se obtuvieron resultados negativos respecto a la posible interacción de Swi1p con Sap1p, estudiadas mediante co-inmunoprecipitación (Lee y col., 2004). Alternativamente, el complejo Swi1p-Swi3p podría no ser el responsable directo de las barreras, sino que su función podría ser estabilizar las horquillas ya detenidas, como han propuesto Noguchi y col. (2004) para horquillas paradas

accidentalmente. Así, en ausencia de Swi1p o Swi3p, dichas horquillas detenidas serían procesadas rápidamente y no serían detectadas en los geles bidimensionales (Figura 25). En el caso de las dos barreras naturales del locus *mat1* tampoco se detectan horquillas detenidas en mutantes *swi1Δ* o *swi3Δ* (Dalgaard y Klar, 2000).

El estudio de la replicación del locus de los genes rRNA en las estirpes *sap1* termosensibles nos ha proporcionado la posibilidad de evaluar la necesidad de Sap1p para la barrera RFB1. Este estudio se realizó con células creciendo a temperatura permisiva, dado que a temperatura restrictiva las muestras de DNA no contenían suficientes intermediarios de replicación.

Es interesante destacar, en primer lugar, que la adición de una etiqueta (FLAG) en el extremo C-terminal de la proteína disminuye la eficiencia de la barrera RFB1 en casi un 50% con respecto a una estirpe silvestre (Figura 29C). Una posibilidad es que la adición de dicha etiqueta produzca una disminución de la capacidad de unión de la proteína al DNA con respecto a la silvestre. Por otra parte, la etiqueta podría interferir en la interacción de Sap1p con el replisoma para detener la replicación. Además, resulta interesante el hecho de que RFP4 sea la barrera cuya eficiencia es la que más aumenta como consecuencia de la modificación de Sap1p en contra de lo que se esperaba, dado que las horquillas que escapan a RFB1 alcanzan las barreras RFB2 y RFB3 antes que la RFP4. Como ha sido propuesto por Krings y Bastia (2004), si la parada de las horquillas en RFP4 es consecuencia de la colisión entre replicación y transcripción, este resultado podría deberse a un incremento de la tasa de transcripción del rDNA o del número de unidades transcripcionales activas debido a la modificación de Sap1p. Recientemente, Machín y col. (2006) han encontrado evidencias en *S. cerevisiae* de que la transcripción de los genes ribosómicos podría interferir con la segregación del rDNA en ausencia de la proteína CDC14.

Por tanto, Sap1p actuaría como un silenciador de la RNA pol I de modo que su modificación incrementaría la actividad transcripcional y, como consecuencia, la frecuencia de colisión entre las maquinarias de replicación y transcripción en RFP4. Esta hipótesis está siendo estudiada en nuestro laboratorio.

En cuanto a la eficiencia de RFB1 en las estirpes *sap1<sup>ts</sup>*, es menor ya incluso a temperatura permisiva, la disminución más significativa se observa en el mutante *sap1-27*, en el que la intensidad de la barrera disminuye más del 50% con respecto a *sap1-FLAG* y el 75% con respecto a la estirpe *sap1<sup>+</sup>* (Figura 29C). Sin embargo, el crecimiento de esta estirpe es el menos afectado a temperatura restrictiva de entre los tres mutantes analizados. De esta forma, es posible que la mutación que contenga *sap1-27* afecte a la función de barrera de Sap1p y no a la función esencial de esta proteína. Estos datos apoyan de nuevo el hecho de que la función esencial de Sap1p no depende de su función de barrera para la replicación en el rDNA. Por su parte, mientras que la mutación *sap1-48* tuvo un efecto más acusado sobre el crecimiento celular, el efecto sobre la función de RFB1 fue menor que en *sap1-27*. Todo esto indica que la naturaleza esencial de Sap1p para el crecimiento celular y su requerimiento para unirse a RFB1 eficientemente no están necesariamente relacionados.

## 2. Sap1p Y SEGREGACIÓN CROMOSÓMICA

Lahondes y col. (2003) analizaron el fenotipo de esporas *sap1Δ* durante su germinación y generadas a partir de una estirpe heterocigótica *sap1<sup>+</sup>/sap1Δ*. Estas esporas nulas para *sap1* sólo son capaces de desarrollar una o, como máximo, dos divisiones celulares. Durante estas divisiones, los autores observaron mitosis anormales que mostraban fallos en la segregación cromosómica, así como núcleos con la cromatina descondensada. Las imágenes procedentes de los mutantes *sap1<sup>ts</sup>* a temperatura restrictiva, sobre todo *sap1-1* y *sap1-48*, mostraron un fenotipo *cut* similar (Figura 29). Todas estas observaciones sugieren que Sap1p podría ser una proteína estructural asociada a cromatina y requerida para la organización del cromosoma. Sin embargo, Sap1p

se muestra como una proteína de unión a DNA con alta especificidad de secuencia, tal y como se ha observado en los estudios de formación de complejos Sap1p-RFB1 (Figuras 19 y 23) y Sap1p-SAS1 (Arcangioli y Klar, 1991). Por tanto, resulta paradójico que una proteína con esta especificidad de secuencia juegue un papel sobre la organización de la cromatina en general. Nosotros trabajamos actualmente con la hipótesis de que, realmente, Sap1p jugaría este papel en la organización de la cromatina específicamente en el rDNA, el cual constituye alrededor del 12% del genoma total. Considerando el número de repeticiones del rDNA en *S. pombe*, éste albergaría unas 150 secuencias de unión de Sap1p ubicadas en ambas regiones subteloméricas del cromosoma III.

Al contrario de lo que cabría esperar de las conclusiones alcanzadas por Lahondes y col. (2003), tras estudiar el efecto deletéreo en la sobre expresión de los 40 aminoácidos C-terminales, en esta tesis se ha comprobado que esta región no es necesaria para la función esencial de Sap1p. Analizando la estructura primaria de la proteína, hemos encontrado dos secuencias que podrían corresponder a sendos motivos denominados “cajas de destrucción” (cajas D) (Figura 35A, fondo amarillo), las cuales son necesarias para una proteólisis regulada de ciclinas (Glutzer y col., 1991). El consenso para este motivo es RXXLGXIXN (Figura 35B), donde los residuos R y L están conservados en todas las cajas descritas de las ciclinas de tipo A y B, así como en ambas cajas D potenciales de Sap1p. El residuo N se conserva sólo en ciclinas tipo B (Glutzer y col., 1991). La caja de destrucción de la ciclina B Cdc13 de *S. pombe* es RHALDDVSN (Yamano y col., 1998). Por tanto, la secuencia de esta caja es bastante variable excepto la secuencia mínima RXXL, presente en las dos posibles cajas D de Sap1p. Estas cajas son necesarias para la ubiquitinación *in vitro* de ciclinas por el complejo APC (Funabiki y col., 1997, Yamano y col., 1998). La presencia de los dos motivos en Sap1p plantea la posibilidad de que la proteína esté bajo un control de regulación por ubiquitinación/degradación. En aparente contradicción con esta hipótesis, la eliminación de los 40 aminoácidos C-terminales de Sap1p, en la que está contenido uno de estos motivos (Figura

35, residuos subrayados), no tiene efectos importantes sobre la viabilidad celular. Sin embargo, la proteína esencial que funciona como securina en *S. pombe*, Cut2p, también contiene dos cajas D y sólo cuando se eliminan ambas se observa un efecto deletéreo (Funabiki y col., 1997). Por tanto, sería necesario estudiar el efecto de la eliminación de las dos cajas D de Sap1p para comprobar si funcionan como tal. El efecto deletéreo observado por Lahondes y col. (2003) por sobre expresión del extremo carboxilo de Sap1p podría deberse al secuestro de factores que reconocen las cajas D, inhibiendo su función sobre la degradación de ciclinas.

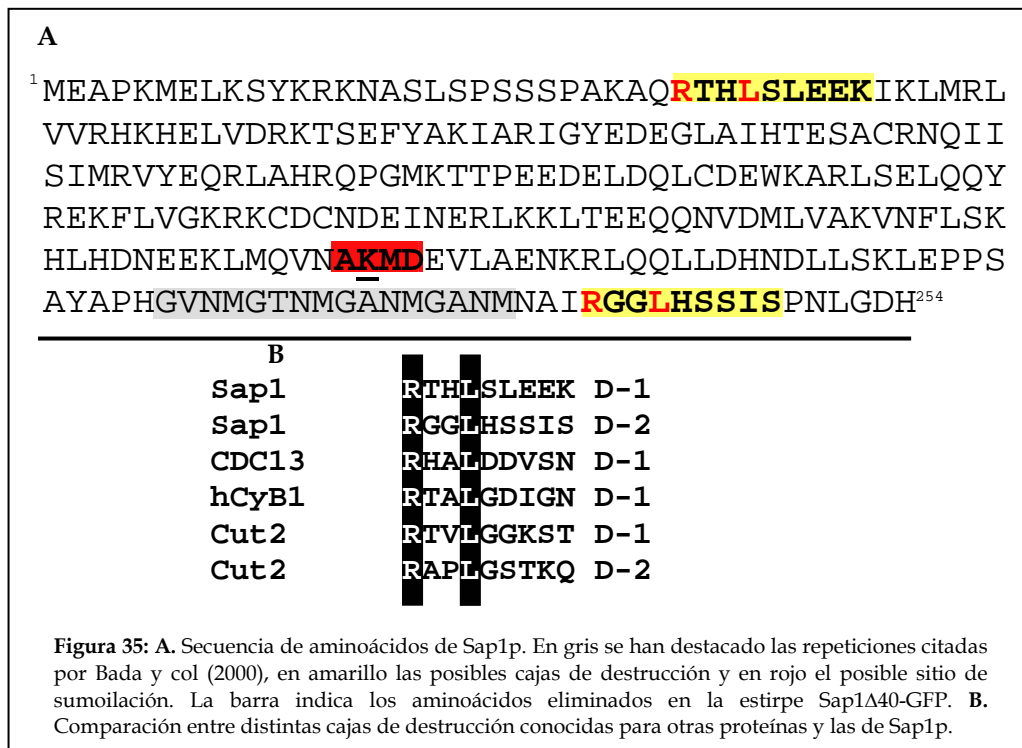
Además de las dos posibles cajas D descritas, el análisis de la estructura primaria de Sap1p reveló la presencia de una secuencia de cuatro aminoácidos que se corresponde al motivo consenso de modificación por adición de SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*) ΨKXE/D (Figura 35A, fondo rojo), donde Ψ representa un aminoácido alifático (Johnson and Blobel, 1999). Las proteínas SUMO forman una familia de péptidos que funcionan uniéndose covalentemente a otras proteínas modificando su función. Esto abre la posibilidad de una posible regulación de la actividad de Sap1p vía sumoilación (adición de SUMO). El hecho de que se haya detectado una interacción en un ensayo de doble híbrido entre Sap1p y la SUMO E3 ligasa Pli1p refuerza esta posibilidad (Lahondes y col., 2003; Xhemalce y col., 2004). Pli1p y, por tanto, la sumoilación, parecen jugar un papel relevante en el mecanismo de mantenimiento de centrómeros y telómeros regulando la recombinación en estas regiones con secuencias repetidas heterocromáticas.

Por otra parte, se han descrito conexiones entre la adición de SUMO y la estructura de la cromatina. La sumoilación antagoniza la activación potencial de factores de transcripción (Ross y col., 2002; Lin y col., 2003), modula la actividad de desacetilasas y acetiltransferasas de histonas (David y col., 2002). En *S. pombe* la modificación por SUMO está involucrada en el mantenimiento de la estabilidad de la heterocromatina, modificando *in vivo* proteínas relacionadas, como Swi6, Chp2 o Clr4.



La posibilidad de que Sap1p sea realmente modificada vía ubiquitinación y sumoilación, su regulación sería semejante a la de PCNA de *S. cerevisiae* (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), la cual puede ser sumoilada o ubiquitinada en el mismo residuo de lisina (K164) (Hoege y col., 2002; Stelter y Ulrich, 2003). Obviamente, es necesario confirmar que Sap1p está regulada, ya sea debido a la modificación por sumoilación o a la degradación vía ubiquitinación, para lo cual ya se están realizando experimentos que esclarecerán esta cuestión.

Esta tesis ha contribuido al conocimiento de una nueva función de Sap1p, cuya unión es necesaria para la parada de las horquillas de replicación en RFB1, y, sin embargo, ha planteado nuevas cuestiones relacionadas con la aún desconocida función de Sap1p, como por ejemplo, la posible relación de la unión de Sap1p al rDNA y la segregación de la cromatina en anafase así como también, de una posible regulación de Sap1p. Dichas cuestiones constituyen el punto de partida para continuar investigando acerca de esta proteína y la relación subyacente entre la replicación y la segregación cromosómica.



## *CONCLUSIONES*

1. La proteína esencial Sap1 reconoce la secuencia de RFB1 localizada en el rDNA de *S. pombe* y se une específicamente a ella *in vitro*.
2. La secuencia del DNA necesaria y suficiente para la actividad de la barrera RFB1 consiste en 30 pb y contiene tres repeticiones imperfectas *a*, *b* y *c* reconocidas por Sap1p.
3. Tanto la parada de la horquilla replicativa como la unión de Sap1p a RFB1 requieren las tres repeticiones *a*, *b* y *c* conjuntamente, lo que indica que la formación del complejo RFB1-Sap1p es necesaria para la función de RFB1.
4. La secuencia SAS1 localizada en el *locus mat1* no provoca parada de la replicación en ninguna de sus dos orientaciones en un plásmido de replicación autónoma.
5. RFB1 no es funcional en estirpes *swi1Δ* y *swi3Δ*.
6. La actividad de RFB1 está parcialmente afectada en las estirpes termosensibles *sap1-27*, y en menor medida en *sap1-48*, a temperatura permisiva, lo que confirma que Sap1p juega un papel importante en la funcionalidad de RFB1.
7. Las estirpes *sap1-1* y *sap1-48* muestran un fenotipo *cut* a temperatura restrictiva, lo que indica que Sap1p tiene una función relacionada con la correcta segregación cromosómica.
8. Los 40 aminoácidos del extremo carboxilo de Sap1p, cuya sobre-expresión es deletérea, no son esenciales para la viabilidad celular.

## *BIBLIOGRAFÍA*

- Arcangioli, B., Copeland, T. D., and Klar, A. J. (1994a). Sap1, a protein that binds to sequences required for mating-type switching, is essential for viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 14, 2058-2065.a
- Arcangioli, B., Ghazvini, M., and Ribes, V. (1994b). Identification of the DNA-binding domains of the switch-activating-protein Sap1 from *S.pombe* by random point mutations screening in *E.coli*. *Nucleic Acids Res* 22, 2930-2937.
- Arcangioli, B., and Klar, A. J. (1991). A novel switch-activating site (SAS1) and its cognate binding factor (SAP1) required for efficient *mat1* switching in *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J* 10, 3025-3032.
- Bada, M., Walther, D., Arcangioli, B., Doniach, S., and Delarue, M. (2000). Solution structural studies and low-resolution model of the *Schizosaccharomyces pombe* sap1 protein. *J Mol Biol* 300, 563-574.
- Bahler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., Mckenzie, A.R., Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P. and Pringle, J.R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14, 943-951.
- Balzi, E., Di Pietro, A., Goffeau, A., van Heerikhuizen, H., and Klotwijk, J. (1985). The RNA polymerase I initiation site and the external transcribed spacer of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* ribosomal RNA genes. *Gene* 39, 165-172.
- Bedinger, P., Hochstrasser, M., Jongeneel, C. V., and Alberts, B. M. (1983). Properties of the T4 bacteriophage DNA replication apparatus: the T4 dda DNA helicase is required to pass a bound RNA polymerase molecule. *Cell* 34, 115-123.
- Bell, L. y. B., B. (1983). Separation of branched from linear DNA by two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 130, 527-535.
- Bomgarden, R. D., Yean, D., Yee, M. C., and Cimprich, K. A. (2004). A novel protein activity mediates DNA binding of an ATR-ATRIP complex. *Journal of Biological Chemistry* 279, 13346-13353.
- Brewer, B. J., and Fangman, W. L. (1987). The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell* 51, 463-471.
- Brewer, B. J., and Fangman, W. L. (1988). A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes. *Cell* 55, 637-643.

- Brewer, B. J., Lockshon, D., and Fangman, W. L. (1992). The arrest of replication forks in the rDNA of yeast occurs independently of transcription. *Cell* 71, 267-276.
- Brewer, B. J., Zakian, V. A., and Fangman, W. L. (1980). Replication and meiotic transmission of yeast ribosomal RNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 6739-6743.
- Caddle, M. S., and Calos M. P. (1994). Specific initiation at an origin of replication from *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 14, 1796-1805.
- Calzada, A., Hodgson, B., Kanemaki, M., Bueno, A., and Labib, K. (2005). Molecular anatomy and regulation of a stable replisome at a paused eukaryotic DNA replication fork. *Genes Dev* 19, 1905-1919.
- Carrigan, C. M., Haarsma, J. A., Smith, M. T., and Wake, R. G. (1987). Sequence features of the replication terminus of the *Bacillus subtilis* chromosome. *Nucleic Acids Res* 15, 8501-8509.
- Codlin, S., and Dalgaard, J. Z. (2003). Complex mechanism of site-specific DNA replication termination in fission yeast. *EMBO Journal* 22, 3431-3440.
- Coskun-Ari, F. F. y. H., T.M. (1997). Sequence-specific interactions in the Tus-Ter complex and the effect of base pair substitutions on arrest of DNA replication in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 272.
- Choi, E. S., Shin, J. A., Kim, H. S., and Jang, Y. K. (2005). Dynamic regulation of replication independent deposition of histone H3 in fission yeast. *Nucleic Acids Res* 33, 7102-7110.
- D'Amours, D., Stegmeier, F., and Amon, A. (2004). Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA. *Cell* 117, 455-469.
- Dalgaard, J. Z., and Klar, A. J. (2000). swi1 and swi3 perform imprinting, pausing, and termination of DNA replication in *S. pombe*. *Cell* 102, 745-751.
- Dalgaard, J. Z., and Klar, A. J. S. (2001). A DNA replication-arrest site RTS1 regulates imprinting by determining the direction of replication at mat1 in *S. pombe*. *Genes Dev* 15, 2060-2068.
- David, G., Neptune, M.A. and DePinho, R.A. (2002). SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities. *J Biol Chem* 277, 23658-23663.

- Defossez, P. A., Prusty, R., Kaeberlein, M., Lin, S. J., Ferrigno, P., Silver, P. A., Keil, R. L., and Guarente, L. (1999). Elimination of replication block protein Fob1 extends the life span of yeast mother cells. *Mol Cell* 3, 447-455.
- Dhar, V., Schildkraut C.L. (1991). Role of EBNA-1 in arresting replication forks at the Epstein-Barr virus *oriP* family of tandem repeats. *Mol Cell Biol* 11, 6268-6278.
- Deshpande, A. M., and Newlon, C. S. (1996). DNA replication fork pause sites dependent on transcription. *Science* 272, 1030-1033.
- Elias-Arnanz, M. y. S. M. (1997). Bacteriophage phi29 DNA replication arrest caused by codirectional collisions with the transcription machinery. *Embo J* 18, 5775-5783.
- Elias-Arnanz, M. y. S. M. (1999). Resolution of head-on collisions between the transcription machinery and bacteriophage phi29 DNA polymerase is dependent on RNA polymerase translocation. *Embo J* 18, 5675-5682.
- Funabiki, H., Yamano, H., Nagao, K., Tanaka, H., Yasuda, H., Hunt, T., and Yanagida, M. (1997). Fission yeast Cut2 required for anaphase has two destruction boxes. *Embo J* 16, 5977-5987.
- Gabrielsen, O. S., and Huet, J. (1993). Magnetic DNA affinity purification of yeast transcription factor. *Methods Enzymol* 218, 508-525.
- Gencheva, M., Anachkova, B., and Russev, G. (1996). Mapping the sites of initiation of DNA replication in rat and human rRNA genes. *J Biol Chem* 271, 2608-2614.
- Gerber, J. K., Gogel, E., Berger, C., Wallisch, M., Muller, F., Grummt, I., and Grummt, F. (1997). Termination of mammalian rDNA replication: polar arrest of replication fork movement by transcription termination factor TTF-I. *Cell* 90, 559-567.
- Ghazvini, M., Ribes, V., and Arcangioli, B. (1995). The essential DNA-binding protein sap1 of *Schizosaccharomyces pombe* contains two independent oligomerization interfaces that dictate the relative orientation of the DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* 15, 4939-4946.
- Giraldo, R., Andreu, J. M., and Diaz-Orejas, R. (1998). Protein domains and conformational changes in the activation of RepA, a DNA replication initiator. *Embo J* 17, 4511-4526.

- Giraldo, R., and Diaz-Orejas, R. (2001). Similarities between the DNA replication initiators of Gram-negative bacteria plasmids (RepA) and eukaryotes (Orc4p)/archaea (Cdc6p). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4938-4943.
- Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-138.
- Granot, D., and Snyder, M. (1991). Segregation of the nucleolus during mitosis in budding and fission yeast. *Cell Motil Cytoskeleton* 20, 47-54.
- Greenfeder, S. A., and Newlon, C. S. (1992). Replication forks pause at yeast centromeres. *Mol Cell Biol* 12, 4056-4066.
- Griffiths, A. A., Andersen, P.A. and Wake, R.G. (1998). Replication terminator protein-based replication fork-arrest systems in various *Bacillus* species. *J Bacteriol* 180, 3360-3367.
- Grummt, I., Sorbaz, H., Hofmann, A., and Roth, E. (1985). Spacer sequences downstream of the 28S RNA coding region are part of the mouse rDNA transcription unit. *Nucleic Acids Res* 13, 2293-2304.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hanahan, D., ed. (1986). *Techniques for transformation of E. coli*. (Oxford, IRL Press).
- Hernandez, P., Martin-Parras, L., Martinez-Robles, M. L., and Schwartzman, J. B. (1993). Conserved features in the mode of replication of eukaryotic ribosomal RNA genes. *Embo J* 12, 1475-1485.
- Hill, T. M. (1992). Arrest of bacterial DNA replication. *Annu Rev Microbiol* 46, 603-633.
- Hill, T. M., Tecklenburg, M. L., Pelletier, A. J., and Kuempel, P. L. (1989). *tus*, the trans-acting gene required for termination of DNA replication in *Escherichia coli*, encodes a DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1593-1597.
- Hindley, J., Phear, G., Stein, M., and Beach, D. (1987). *Suc1+* encodes a predicted 13-kilodalton protein that is essential for cell viability and is directly involved in the division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 7, 504-511.
- Hirano, S., Funahashi, S.I., Uemura, T. and Yanagida, M. (1986). Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe cut* mutants that block nuclear division but not cytokinesis. *Embo J* 8, 1737-1744.



- Hoegel, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-141.
- Holmes, A. M., Kaykov, A., and Arcangioli, B. (2005). Molecular and cellular dissection of mating-type switching steps in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 25, 303-311.
- Huberman, J. A. (1987). Eukaryotic DNA replication: a complex picture partially clarified. *Cell* 48, 7-8.
- Hyrien, O. (2000). Mechanisms and consequences of replication fork arrest. *Biochimie* 82, 5-17.
- Imbalzano, A. N., K. S. Zaret and R. E. Kingston (1994). Transcription Factor (TF) IIB and TFIIA Can Independently Increase the Affinity of the TATA-binding protein for DNA. *Journal of Biological Chemistry* 269, 8280-8286.
- Ivessa, A. S., Lenzmeier, B. A., Bessler, J. B., Goudsouzian, L. K., Schnakenberg, S. L., and Zakian, V. A. (2003). The *Saccharomyces cerevisiae* helicase Rrm3p facilitates replication past nonhistone protein-DNA complexes. *Mol Cell* 12, 1525-1536.
- Ivessa, A. S., Zhou, J. Q., and Zakian, V. A. (2000). The *Saccharomyces* Pif1p DNA helicase and the highly related Rrm3p have opposite effects on replication fork progression in ribosomal DNA. *Cell* 100, 479-489.
- Johnson, E. S., and Blobel, G. (1999). Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J Cell Biol* 147, 981-994.
- Jürg Bähler, J.-Q. W., Mark S. Longtine, Nirav G. Shah, Amos Mckenzie III, Alexander B. Steever, Achim Wach, Peter Philippsen, John R. Pringle (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14, 943-951.
- Kaplan, D. L., and O'Donnell, M. (2002). DnaB drives DNA branch migration and dislodges proteins while encircling two DNA strands. *Molecular Cell* 10, 647-657.
- Katou, Y., Kanoh, Y., Bando, M., Noguchi, H., Tanaka, H., Ashikari, T., Sugimoto, K., and Shirahige, K. (2003). S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex. *Nature* 424, 1078-1083.
- Kaykov, A., Holmes, A. M., and Arcangioli, B. (2004). Formation, maintenance and consequences of the imprint at the mating-type locus in fission yeast. *EMBO Journal* 23, 930-938.

Keil, R. L., and Roeder, G. S. (1984). Cis-acting, recombination-stimulating activity in a fragment of the ribosomal DNA of *S. cerevisiae*. *Cell* 39, 377-386.

Kobayashi, T. (2003). The replication fork barrier site forms a unique structure with Fob1p and inhibits the replication fork. *Mol Cell Biol* 23, 9178-9188.

Kobayashi, T., and Ganley, A. R. (2005). Recombination regulation by transcription-induced cohesin dissociation in rDNA repeats. *Science* 309, 1581-1584.

Kobayashi, T., Heck, D. J., Nomura, M., and Horiuchi, T. (1998). Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I. *Genes Dev* 12, 3821-3830.

Kobayashi, T., Hidaka, M., Nishizawa, M., and Horiuchi, T. (1992). Identification of a site required for DNA replication fork blocking activity in the rRNA gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 233, 355-362.

Kobayashi, T., and Horiuchi, T. (1996). A yeast gene product, Fob1 protein, required for both replication fork blocking and recombinational hotspot activities. *Genes Cells* 1, 465-474.

Kobayashi, T., Nomura, M., and Horiuchi, T. (2001). Identification of DNA cis elements essential for expansion of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21, 136-147.

Kralicek, A. V., Wilson, P. K., Ralston, G. B., Wake, R. G., and King, G. F. (1997). Reorganization of terminator DNA upon binding replication terminator protein: implications for the functional replication fork arrest complex. *Nucleic Acids Res* 25, 590-596.

Krings, G., and Bastia, D. (2004). swi1- and swi3-dependent and independent replication fork arrest at the ribosomal DNA of *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14085-14090.

Krings, G., and Bastia, D. (2005). Sap1p binds to Ter1 at the ribosomal DNA of *Schizosaccharomyces pombe* and causes polar replication fork arrest. *J Biol Chem* 280, 39135-39142.

Krings, G. a. B., D. (2006). Molecular architecture of a eukaryotic DNA replication terminus-terminator protein complex. *Mol Cell Biol* *In press*.

Krogan, N. J., Lam, M. H. Y., Fillingham, J., Keogh, M. C., Gebbia, M., Li, J., Datta, N., Cagney, G., Buratowski, S., Emili, A., and Greenblatt, J. F. (2004).

Proteasome involvement in the repair of DNA double-strand breaks. *Molecular Cell* 16, 1027-1034.

Kuhn, A., Bartsch, I., and Grummt, I. (1990). Specific interaction of the murine transcription termination factor TTF I with class-I RNA polymerases. *Nature* 344, 559-562.

Lahondes, R., Ribes, V., and Arcangioli, B. (2003). Fission yeast Sap1 protein is essential for chromosome stability. *Eukaryot Cell* 2, 910-921.

Lang, W. H., and Reeder, R. H. (1993). The REB1 site is an essential component of a terminator for RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 13, 649-658.

Lee, B. S., Grewal, S. I. S., and Klar, A. J. S. (2004). Biochemical interactions between proteins and *mat1* cis-acting sequences required for imprinting in fission yeast. *Molecular and Cellular Biology* 24, 9813-9822.

Lin, X., Lianq, M., Lianq, Y.Y., Brunicardi, F.C. and Fenq X.H. (2003). SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor supressor Smad4. *J Biol Chem* 278, 31043-31048.

Linskens, M. H., and Huberman, J. A. (1988). Organization of replication of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 8, 4927-4935.

Little, R. D., Platt, T. H., and Schildkraut, C. L. (1993). Initiation and termination of DNA replication in human rRNA genes. *Mol Cell Biol* 13, 6600-6613.

Liu, B., Alberts BM (1995). Head-on collision between a DNA replication apparatus and RNA polymerase complex. *Science* 267, 1131-1137.

Liu, B., Wong. M.L., Tinker, R.L. and Alberts B. M. (1993). DNA replication fork can pass RNA polymerase without displacing the nascent transcript. *Nature* 366, 33-39.

Long, E. O., and Dawid, I. B. (1980). Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 49, 727-764.

López-Estraño, C., Schvartzman, J. B., Krimer, D. B., and Hernandez, P. (1999). Characterization of the pea rDNA replication fork barrier: putative cis-acting and trans-acting factors. *Plant Mol Biol* 40, 99-110.

López-Estraño, C., Schvarzman, J.B. and Hernández P. (1997). The replication of ribosomal RNA genes in eukaryotes. . *Chromosome Today* 12, 149-169.

- López-Estraño C., S., Schwartzman J. B., Krimer D. B. and Hernández, P (1998). Co-localization of polar replication fork barriers and rRNA transcription terminators in mouse rDNA. *Journal of Molecular Biology* 277, 249-256.
- Machín, F. T.-R., J, De Piccoli, G., Carballo, J.A., Cha, R.S., Jarmuz, A. and Aragón L. (2006). Transcription of ribosomal genes can cause nondisjunction. *Journal of Cell Biology* 173, 893-903.
- Maleszka, R., and Clark-Walker, G. D. (1993). Yeasts have a four-fold variation in ribosomal DNA copy number. *Yeast* 9, 53-58.
- Martin\_Parras, L., Hernandez, P., Martinez\_Robles, M. L., and Schwartzman, J. B. (1992). Initiation of DNA replication in ColE1 plasmids containing multiple potential origins of replication. *J Biol Chem* 267, 22496-22505.
- Mayer, M. L., Pot, I., Chang, M., Xu, H., Aneliunas, V., Kwok, T., Newitt, R., Aebersold, R., Boone, C., Brown, G. W., and Hieter, P. (2004). Identification of protein complexes required for efficient sister chromatid cohesion. *Mol Biol Cell* 15, 1736-1745.
- Melekhovets, Y. F., Shwed, P. S., and Nazar, R. N. (1997). In vivo analyses of RNA polymerase I termination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* 25, 5103-5109.
- Miller, K. M., Rog, O., and Cooper, J. P. (2006). Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1. *Nature* 440, 824-828.
- Mohanty, B. K., and Bastia, D. (2004). Binding of the replication terminator protein Fob1p to the Ter sites of yeast causes polar fork arrest. *J Biol Chem* 279, 1932-1941.
- Mohanty, B. K., Sahoo, T., and Bastia, D. (1996). The relationship between sequence-specific termination of DNA replication and transcription. *Embo J* 15, 2530-2539.
- Mohanty, B. K., Sahoo, T., and Bastia, D. (1998). Mechanistic studies on the impact of transcription on sequence-specific termination of DNA replication and vice versa. *J Biol Chem* 273, 3051-3059.
- Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* 194, 795-823.
- Moll, J. R., A. Achiarya, J. Gal, A. A. Mir and C. Vinson (2002). Manganese is required for specific DNA binding of the CREB B-ZIP domain. *Nucleic Acids Res* 30, 1240-1246.

- Muller, M., Lucchini, R., and Sogo, J. M. (2000). Replication of yeast rDNA initiates downstream of transcriptionally active genes. *Mol Cell* 5, 767-777.
- Noguchi, E., Noguchi, C., Du, L. L., and Russell, P. (2003). Swi1 prevents replication fork collapse and controls checkpoint kinase Cds1. *Molecular and Cellular Biology* 23, 7861-7874.
- Noguchi, E., Noguchi, C., McDonald, W. H., Yates, J. R., and Russell, P. (2004). Swi1 and Swi3 are components of a replication fork protection complex in fission yeast. *Molecular and Cellular Biology* 24, 8342-8355.
- Olavarrieta, L., Hernandez, P., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B. (2002). DNA knotting caused by head-on collision of transcription and replication. *Journal of Molecular Biology* 322, 1-6.
- Pasero, P., and Marilley, M. (1993). Size variation of rDNA clusters in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 236, 448-452.
- Paule, M. R., and White, R. J. (2000). Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res* 28, 1283-1298.
- Pelletier, R., Krasilnikova, M. M., Samadashwily, G. M., Lahue, R., and Mirkin, S. M. (2003). Replication and expansion of trinucleotide repeats in yeast. *Molecular and Cellular Biology* 23, 1349-1357.
- Prentice, H. L. (1992). High efficiency transformation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acid Research* 20, 621.
- Putter, V., and Grummt, F. (2002). Transcription termination factor TTF-I exhibits contrahelicase activity during DNA replication. *EMBO Rep* 3, 147-152.
- Ross, S., Best, J.L., Zon, L.I. and Gill, G. (2002). SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell* 10, 831-842.
- Samadashwily, G. M., Raca, G., and Mirkin, S. M. (1997). Trinucleotide repeats affect DNA replication in vivo. *Nat Genet* 17, 298-304.
- Sánchez-Gorostiaga, A. (2003) Estudio de las barreras para la replicación en el DNA ribosómico de *Schizosaccharomyces pombe*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.
- Sánchez-Gorostiaga, A., López-Estraño, Carlos, Krimer, Dora B., Schwartzman, Jorge B., Hernandez, Pablo (2004). Transcription Termination Factor reb1p

Causes Two Replication Fork Barriers at Its Cognate Sites in Fission Yeast Ribosomal DNA In Vivo. *Mol Cell Biol* 24, 398-406.

Santamaria, D., de la Cueva, G., Martinez-Robles, M. L., Krimer, D. B., Hernandez, P., and Schwartzman, J. B. (1998). DnaB helicase is unable to dissociate RNA-DNA hybrids. Its implication in the polar pausing of replication forks at Cole1 origins. *J Biol Chem* 273, 33386-33396.

Sato, M., Dhut, S., and Toda, T. (2005). New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 22, 583-591.

Stegmeier, F., and Amon, A. (2004). Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Annu Rev Genet* 38, 203-232.

Stelter, P. a. U. H. D. (2003). Control of spontaneous and damage induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* 425, 188-191.

Styrkarsdottir U., R. E. a. O. N. (1993). The *smt-0* mutation which abolishes mating-type switching in fission yeast is a deletion. *Curr Genet* 23, 184-186.

Takeuchi, Y., Horiuchi, T., and Kobayashi, T. (2003). Transcription-dependent recombination and the role of fork collision in yeast rDNA. *Genes Dev* 17, 1497-1506.

Torres, J. Z., Bessler, J. B., and Zakian, V. A. (2004). Local chromatin structure at the ribosomal DNA causes replication fork pausing and genome instability in the absence of the *S. cerevisiae* DNA helicase Rrm3p. *Genes Dev* 18, 498-503.

Uemura, T. a. Y., M. (1984). Isolation of type I and II DNA topoisomerase mutants from fission yeast: single and double mutants show different phenotypes in cell growth and chromatin organization. *Embo J* 8, 1737-1744.

Veaute, X., Jeusset, J., Soustelle, C., Kowalczykowski, S. C., Le Cam, E., and Fabre, F. (2003). The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature* 423, 309-312.

Vengrova, S., Codlin, S., and Dalgaard, J. Z. (2002). RTS1-an eukaryotic terminator of replication. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 1031-1034.

Vengrova, S., and Dalgaard, J. Z. (2004). RNase-sensitive DNA modification(S) initiates *S. pombe* mating-type switching. *Genes & Development* 18, 794-804.

Viguera, E., Hernandez, P., Krimer, D. B., Boistov, A. S., Lurz, R., Alonso, J. C., and Schwartzman, J. B. (1996). The Cole1 unidirectional origin acts as a polar replication fork pausing site. *J Biol Chem* 271, 22414-22421.

- Ward, T. R., Hoang, M. L., Prusty, R., Lau, C. K., Keil, R. L., Fangman, W. L., and Brewer, B. J. (2000). Ribosomal DNA replication fork barrier and HOT1 recombination hot spot: shared sequences but independent activities. *Mol Cell Biol* 20, 4948-4957.
- Warner, J. R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in Biochemical Sciences* 24, 437-440.
- Wiesendanger, B., Lucchini, R., Koller, T., and Sogo, J. M. (1994). Replication fork barriers in the *Xenopus* rDNA. *Nucleic Acids Res* 22, 5038-5046.
- Xhemalce, B., Seeler, J. S., Thon, G., Dejean, A., and Arcangioli, B. (2004). Role of the fission yeast SUMO E3 ligase Pli1p in centromere and telomere maintenance. *Embo J* 23, 3844-3853.
- Yamano, H., Kominami, K., Harrison, C., Kitamura, K., Katayama, S., Dhut, S., Hunt, T., and Toda, T. (2004). Requirement of the SCFPop1/Pop2 ubiquitin ligase for degradation of the fission yeast S phase cyclin Cig2. *Journal of Biological Chemistry* 279, 18974-18980.
- Yamano, H., Tsurumi C., Gannon J. and Hunt T. (1998). The role of the destruction box and its neighbouring lysine residues in cyclin B for anaphase ubiquitin-dependent proteolysis in fission yeast: defining the D-box receptor. *Embo J* 17, 5670-5678.
- Yang, M. Y., Bowmaker, M., Reyes, A., Vergani, L., Angeli, P., Gringeri, E., Jacobs, H. T., and Holt, I. J. (2002). Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell* 111, 495-505.
- Zhao, A., Guo, A., Liu, Z., and Pape, L. (1997). Molecular cloning and analysis of *Schizosaccharomyces pombe* Reb1p: sequence-specific recognition of two sites in the far upstream rDNA intergenic spacer. *Nucleic Acids Res* 25, 904-910.

*ANEXO*



# The Mating Type Switch-Activating Protein Sap1 Is Required for Replication Fork Arrest at the rRNA Genes of Fission Yeast

Eva Mejía-Ramírez, Alicia Sánchez-Gorostiaga, Dora B. Krimer,  
Jorge B. Schwartzman, and Pablo Hernández\*

Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC),  
Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

Received 31 March 2005/Returned for modification 10 May 2005/Accepted 3 July 2005

*Schizosaccharomyces pombe* rRNA genes contain three replication fork barriers (RFB1-3) located in the nontranscribed spacer. RFB2 and RFB3 require binding of the transcription terminator factor Reb1p to two identical recognition sequences that colocalize with these barriers. RFB1, which is the strongest of the three barriers, functions in a Reb1p-independent manner, and cognate DNA-binding proteins for this barrier have not been identified yet. Here we functionally define RFB1 within a 78-bp sequence located near the 3' end of the rRNA coding region. A protein that specifically binds to this sequence was purified by affinity chromatography and identified as Sap1p by mass spectrometry. Specific binding to RFB1 was confirmed by using Sap1p expressed in *Escherichia coli*. Sap1p is essential for viability and is required for efficient mating-type switching. Mutations in RFB1 that precluded formation of the Sap1p-RFB1 complex systematically abolished replication barrier function, indicating that Sap1p is required for replication fork blockage at RFB1.

DNA replication fork arrest induced by DNA lesions or as a consequence of errors during replication is an important cause of genome instability. Cells respond to this challenge by activating both the S-phase checkpoint pathway that slows down DNA replication and DNA repair mechanisms, which eliminate DNA lesions and reactivate the arrested replication forks. Aside from these accidental fork arrests, there are natural replication fork pausing sites that seem to play specific biological roles. The rRNA genes of all eukaryotic species studied so far contain several replication fork barriers (RFBs) (5, 9, 18–20, 26, 28, 29). RFBs are clustered and located in the nontranscribed spacer close to the 3' end of the coding region. In most of the species studied, these RFBs function in a polar manner, arresting only replication forks moving in the direction opposite to transcription. As a consequence, rRNA genes are mainly replicated unidirectionally and cooriented with transcription. Therefore, one of the roles of rRNA gene RFBs may be to prevent the deleterious effects of head-on collisions between replication and transcription machineries (24, 27).

For *Saccharomyces cerevisiae* rRNA genes, Fob1p is required for the activity of RFBs and directly binds to the DNA at the barriers (12, 21). How Fob1p inhibits progression of the replisome, however, is still unknown. In this budding yeast, Fob1p-dependent RFBs are also required for *HOT1* recombination, the expansion and contraction of rRNA gene repeats, and the formation of extrachromosomal rRNA gene circles (11, 13, 14), indicating that fork arrest at RFBs promotes homologous recombination within the rRNA gene locus (4).

*Schizosaccharomyces pombe* rRNA genes contain three independent closely spaced barriers, RFB1 to -3. RFB2 and RFB3 require binding of the transcription termination protein

Reb1 to two 17-bp recognition sequences present close to the 3' end of the 35S gene (26). RFB1 is the strongest of the three barriers and functions in a Reb1p-independent manner. Here we identify the mating type switch-activating protein Sap1 as the cognate DNA-binding protein for RFB1 and show that formation of the RFB1-Sap1p complex is required for replication fork stalling at this barrier.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell strains and growth conditions.** The *S. pombe* strain 35 (*h<sup>+</sup> leu1-32*) was used in most of the experiments. To test the requirement of the proteins Swi1 and Swi3 for RFB1 function, we used strains EN3182 (*h<sup>+</sup> leu1-32 ura-D18 swi1::Kan<sup>r</sup>*) and EN3366 (*h<sup>+</sup> leu1-32 ura-D18 swi3::Kan<sup>r</sup>*), which were kindly provided by Paul Russell. Standard media and growth conditions were employed (22). *Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$  was used as the host for the construction of plasmids containing rRNA gene sequences, and strain TOP10 was used for the expression of Sap1p.

**Construction of plasmids containing rRNA gene sequences.** Plasmids were constructed by inserting rRNA gene fragments into the polycloning site of vector pIRT2, close to the replication origin *arsI*. The transformation of *S. pombe* was performed by electroporation (25). The fragments shown in Fig. 1 were obtained by PCR from plasmid pIRT1.6(+) (26), using the following primers (listed in Table 1): SpRFB3-1 and SpRFB4 for p $\Delta$ 604-879, SpRFB3-2 and SpRFB4 for p $\Delta$ 677-879, SpRFB3-3 and SpRFB4 for p $\Delta$ 737-879, SpRFB3-2 and SpRFB3-4up for p $\Delta$ 677-825, SpRFB3-2 and SpRFB3-3up for p $\Delta$ 677-754 and SpRFB3-3 and SpRFB3-4up for p $\Delta$ 737-825. The PCR products were digested with PstI and BamHI and inserted into the polycloning site of pIRT2 (10). The fragments shown in Fig. 3 and 4 were obtained by annealing the following oligonucleotides (Table 1): SpIa and SpIb for fragment I, SpIIa and SpIIb for fragment II, SpIIIa and SpIIIb for fragment III, SpIVa and SpIVb for fragment IV, RFB1wt-a and RFB1wt-b for fragment wt, mut1a and mut1b for fragment mut1, mut2a and mut2b for fragment mut2, mut3a and mut3b for fragment mut3, mut4a and mut4b for fragment mut4, and mut5a and mut5b for fragment mut5. The annealed oligonucleotides were inserted into pIRT2 digested with BamHI and PstI (fragments in Fig. 3) or with BamHI (fragments in Fig. 4). All insertions were confirmed by sequencing.

**Two-dimensional gel electrophoresis.** DNA purification from asynchronous log-phase cultures and analyses of replication intermediates by two-dimensional (2D) gel electrophoresis were performed as previously described (26). Before analysis, plasmids were digested with PvuII. The large PvuII fragment from pIRT2 was used as a probe.

\* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain. Phone: 34 918 373 112. Fax: 34 915 360 432. E-mail: p.hernandez@cib.csic.es.

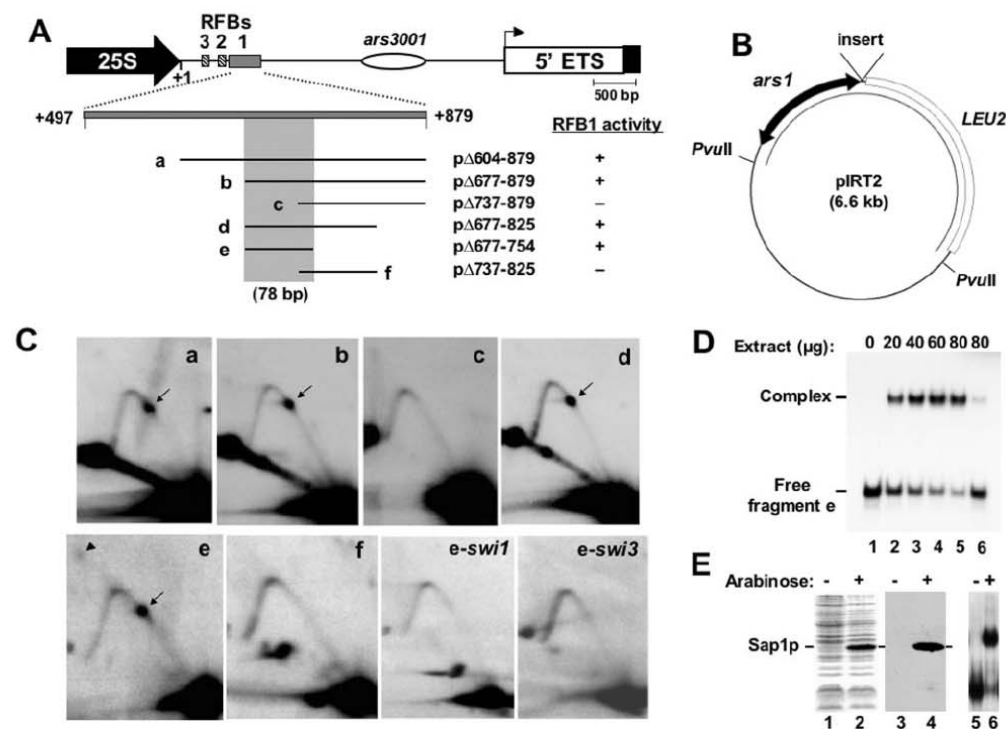


FIG. 1. Barrier RFB1 maps to a 78-bp DNA fragment that is specifically recognized by a binding protein. (A) Diagram of the nontranscribed spacer of the *S. pombe* rRNA gene, with the locations of the three barriers (RFB1-3) and the replication origin *ars3001* indicated. Below the map, lines a to f correspond to the deleted fragments inserted in pIRT2 and assayed as shown in panel C. The names of the resultant plasmids and the results obtained are shown to the right. (B) Map of vector pIRT2 indicating the site where the fragments shown in panel A were cloned (insert). (C) RFB1 activity of fragments a to f in wild-type strain 35 (panels a to f) and RFB1 activity of fragment e in *swi1* (EN3182) and *swi3* (EN3366) mutant strains (panels e-*swi1* and e-*swi3*). Arrows point to the signals corresponding to Y-shaped accumulated replication intermediates with the fork arrested at RFB1. (D) EMSA using labeled fragment e and the indicated amounts of protein extract. In lane 6, a 166-fold excess of unlabeled fragment e was added to the binding reaction. (E) Expression of Sap1p in *E. coli* TOP10 cells was induced by the addition of 0.02% arabinose to the culture for 2 h. Proteins from  $2.5 \times 10^8$  cells were separated in 12% SDS-polyacrylamide gels (lanes 1 and 2) and transferred to polyvinylidene difluoride membranes, and His<sub>6</sub>-Sap1p was detected with anti-His<sub>6</sub>-peroxidase antibody (Roche) (lanes 3 and 4). Lanes 5 and 6 correspond to mobility shift assays using 4.7 µg of a protein extract from noninduced (–) or induced (+) cells and the same fragment as that used for panel D.

**Protein extracts.** *S. pombe* whole-cell extracts were prepared from asynchronous mid-log-phase cultures (100 ml). Cells were harvested and resuspended in 40 µl of extraction buffer (25 mM HEPES, pH 7.6, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 25% glycerol, 4 µg/ml leupeptin, 2 mM dithiothreitol [DTT], 2 µg/ml pepstatin, 2 µg/ml aprotinin, and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). After cell wall disruption with 425- to 600-µm glass beads (Sigma), the emulsion was diluted with 600 µl of extraction buffer, transferred to a new tube, and clarified by centrifugation. The recovered supernatant was divided into aliquots and stored at –80°C. The protein concentration was estimated by the Bradford method. *E. coli* protein extracts were prepared as previously described (8).

**Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).** Binding reaction mixtures (20 µl) included 8 µl of extraction buffer containing the indicated amounts of protein extract or purified Sap1p, 2 µl of 10× binding buffer (250 mM HEPES, pH 7.6, 350 mM KCl, 100 mM EDTA), 1 µl of 2-µg/µl poly(dI-dC), 2 µl of 1-µg/µl salmon sperm DNA, 1 µl of 10 mM DTT, and 6 µl of radiolabeled probe (0.04 to 0.8 ng; 10,000 cpm). The probe used for Fig. 1 was obtained by PCR from pIRT1.6(+), using primers SpRFB3-2 and SpRFB3-3up (Table 1), followed by digestion with BamHI. To obtain the probes used for Fig. 3 and 4, the pIRT2-

derivative plasmids containing each of the fragments were used in PCRs with primers pIRT2-ars1up and pIRT2-leu2do. The products were then digested with BamHI-HindIII (Fig. 3) or with BamHI (Fig. 4). All probes were labeled by filling the 5' protruding ends with [α-<sup>32</sup>P]dCTP and the Klenow fragment and were purified through a G-25 Sephadex column (Roche). Binding reaction mixtures were incubated for 20 min at room temperature and electrophoresed at 4°C in 6% polyacrylamide–0.5× Tris-borate-EDTA gels at 10 V/cm for 2.5 h.

**Expression of Sap1p in *Escherichia coli*.** The *sap1* gene was obtained by PCR amplification from genomic DNA using the primers SapEcoHis and SapHind (Table 1). The PCR product was digested with EcoRI and HindIII to generate sticky ends and inserted into the expression vector pBAD24 (Invitrogen) digested with the same enzymes. The plasmid obtained was used to transform the *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen), and the expression of Sap1p was induced by the addition of 0.02% arabinose to exponentially growing cells for 2 h. The total proteins from  $2.5 \times 10^8$  cells were separated in 12% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes, and His<sub>6</sub>-Sap1p was detected by using anti-His<sub>6</sub>-peroxidase antibody (Roche).

TABLE 1. List of oligonucleotides used for this study

Name	Sequence (5'-3') <sup>a</sup>
SpRFB4	.....CCCGGATCCTATGACATTACGTTAAAC
SpRFB3-1	.....CCCCTGCAGAGGTAGGTCGTAATCGT
SpRFB3-2	.....CCCCTGCAGAAATAGGAGAGGGATTAA
SpRFB3-2bio	.....Biotin-CCCCTGCAGAAATAGGAGAGGGATTAA
SpRFB3-3	.....CCCCTGCAGTTCAAGTTCATTGTAA
SpRFB3-4	.....CCCCTGCAGGAGAACATTTTGGACAT
SpRFB3-3up	.....CCCGGATCCTTACAAATGGAACCTGAA
SpRFB3-4up	.....CCCGGATCCATGTCCAAAAATGTTCTC
SpIa	.....GATCCCTTGCACTGCGTTAAATCCCTCTCTATTCTGCA
SpIb	.....GAATAGGAGAGGGATTTAACGCAGTGAAGGG
SpIIa	.....GATCCACCACCAAGATAGCTCCTTGCACTGCGTTACTGCA
SpIIb	.....GTAACGCAGTGAAGGAGCTATCTTGGTGGTG
SpIIIa	.....GATCCATTGAAAAGGGGGAACCAAGATAGCTCTGCA
SpIIIb	.....GAGCTATCTTGGTGGTTCCCTCTTTCAAATG
SpIVa	.....GATCCTTACAAATGGAACCTTGAAATTTGAAAAGGGGAGTGA
SpIVb	.....GTCCCTCTTTTCAAATTTCAAGTTCCATTGTAAAG
RFB1wt-a	.....GATCCAGGGATTTAACGCAGTGAAGGAGCTATCTTGGTGGTG
RFB1wt-b	.....GATCCACCACCAAGATAGCTCCTTGCACTGCGTTAAATCCCTG
Mut1a	.....GATCCCTTTCTTTAACGCAGTGAAGGAGCTATCTTGGTGGTG
Mut1b	.....GATCCACCACCAAGATAGCTCCTTGCACTGCGTTAAAGAAAGG
Mut2a	.....GATCCAGGGATTGCCATCAGTGAAGGAGCTATCTTGGTGGTG
Mut2b	.....GATCCACCACCAAGATAGCTCCTTGCACTGATGGCAATCCCTG
Mut3a	.....GATCCAGGGATTTAACGCAGTGAAGGAGCTATCTTGGTGGTG
Mut3b	.....GATCCACCACCAAGATAGCTAAGGCTGCACTGCGTTAAATCCCTG
Mut4a	.....GATCCAGGGATTTAACGCAGTGAAGGAGCTAGCGTTGGTGGTG
Mut4b	.....GATCCACCACCAAGCGCTAGCTTGCAGTGGTAAATCCCTG
Mut5a	.....GATCCAGGGATTTAACGCAGTGAAGGAGCTATCTTGTGGTG
Mut5b	.....GATCCCAACACAAGATAGCTCCTTGCACTGCGTTAAATCCCTG
pIRT2-ars1up	.....CTGATGGAGGACTCGATTAAATG
pIRT2-leu2do	.....TCCCATAAATGGTGAAAGTTCC
SpEcoHis	.....CCCGAATTACCATGCATCATCATCATATGGAAGCTCCCAAGATGGAAGTGAAGAGC
SapHind	.....CCCAAGCTTGTGGGATTAATGTGTCACCA

<sup>a</sup> Restriction enzyme sites used for cloning or DNA labeling are shown in bold.

**Purification of Sap1p.** The 78-bp fragment containing RFB1 and analyzed in the mobility shift assay (Fig. 1) was used to purify Sap1p by affinity chromatography. A biotinylated DNA fragment was generated from pIRT1.6(+) by PCR using the primers SpRFB3-2bio and SpRFB3-3. The product was concentrated using Microcon-PCR columns (Millipore) and eluted with TEN100 (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl). To purify Sap1p, 125 µg of streptavidin magnetic particles (SMP; Roche) was washed with TEN100 and resuspended in 80 µl of TEN100 containing 13.5 µg of biotinylated DNA. This mixture was incubated for 15 min at room temperature with occasional stirring to promote binding of the DNA to the SMP. Unbound DNA was removed by washing the particles with TEN100 (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 M NaCl). DNA-SMP complexes were equilibrated with a solution identical to the binding reaction mixture without protein, and 4.5 mg of protein extract in binding reaction mixture was added. After incubation at room temperature for 20 min, protein-DNA-SMP complexes were washed twice with binding reaction mixture. Finally, proteins were eluted from DNA by incubation in elution buffer (25 mM HEPES, pH 7.6, 1 M KCl, 25 mM EDTA, 0.5 mM DTT) for 15 min at room temperature. The samples obtained from seven purifications were pooled, dialyzed against storage buffer (0.5 M KCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, and 10% glycerol), and run in a 12% SDS-polyacrylamide gel. Three bands of about 30 kDa with very similar mobilities were obtained. The protein in each band was analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (performed at the CBMSO Proteomic Service, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain). The resulting data were searched using Mascot and Profound search routines. The protein corresponding to each band was identified as Sap1.

## RESULTS AND DISCUSSION

**RFB1 is a protein binding sequence.** The *S. pombe* rRNA gene barrier RFB1 was previously mapped within a 383-bp region that contains the sequences required to stall replication forks in a polar manner (26). This fragment lies between nu-

cleotides +497 and +879 of the nontranscribed spacer, with the first nucleotide after the end of the 25S gene considered +1 (Fig. 1A).

We made systematic external deletions of the 383-bp region to delimit the minimal *cis*-acting sequence of RFB1 (Fig. 1A). The fragments obtained by PCR were directionally ligated close to the *arsI* replication origin of vector pIRT2 so that the clockwise-moving fork meets the insert in the same direction in which the barrier is active in its chromosomal context (Fig. 1A and B). Plasmids were digested with PvuII, and replication intermediates were analyzed by 2D gel electrophoresis. The probe used detected the insert-containing fragment (Fig. 1B).

Three 5' external deletions were analyzed (Fig. 1A, fragments a, b, and c). Fragments a and b conserved the capacity to arrest replication forks, as confirmed by the strong spot that appeared at the expected position on the arc of the Y-shaped replication intermediates (arrows in Fig. 1C, panels a and b). Thus, the 5' half of the 383-bp region was dispensable for RFB1 function. On the other hand, no arrest sites were detected for fragment c, as indicated by the spotless simple Y arc (Fig. 1C, panel c). Since it could not be ruled out that sequences in fragment c were required (although insufficient) for fork arrest, two 3' deletions of fragment b were also analyzed (Fig. 1A, fragments d and e). Both of these fragments gave a positive result in the assay (Fig. 1C, panels d and e), whereas no arrest sites were identified within the internal fragment f (panel f). Altogether, these results demonstrate that the 78-bp

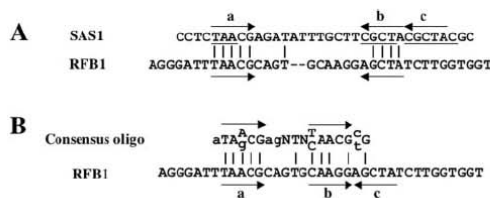


FIG. 2. Sequence comparisons of RFB1 and previously reported Sap1p recognition sequences. (A) RFB1 and SAS1 sequences; (B) RFB1 and consensus sequences. Upper- and lowercase letters in the consensus oligonucleotide indicate higher and lower nucleotide frequencies, respectively, according to the work of Ghazvini et al. (7) (see text for details).

fragment e contains the sequences required to block replication at RFB1. Double-Y intermediates were also visible in the 2D gels of the active fragments, indicating that the termination of replication takes place at the barrier in at least a fraction of the plasmid molecules (arrowhead in Fig. 1C, panel e, and after longer exposures of panels a, b, and d).

The nucleotide sequence of fragment e does not show any feature that might induce a secondary structure potentially able to stall replication forks. As in the case of RFB2 and RFB3, we considered that a *trans*-acting factor(s) could directly bind to this sequence. To address this possibility, an EMSA was performed with fragment e and a crude protein extract of *S. pombe* cells. The result confirmed that the 78-bp RFB1-containing fragment formed a stable DNA-protein com-

plex, which was more abundant as the amount of protein extract increased (Fig. 1D, lanes 2 to 5). The specificity of this complex was verified by the addition of an excess of unlabeled fragment e to the reaction (Fig. 1D, lane 6).

The mating type switch-activating protein Sap1 binds specifically to RFB1. The protein that binds RFB1 was purified by means of affinity chromatography and identified as the mating type switch-activating protein Sap1 by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (see Materials and Methods). To confirm the specific binding of Sap1p to RFB1, the coding gene *sap1* was cloned into the *Escherichia coli* vector pBAD24, and its expression was induced with arabinose (Fig. 1E, lanes 1 and 2). The addition of six histidines at the amino-terminal end of Sap1p allowed its detection by Western blotting (Fig. 1E, lanes 3 and 4). A protein extract from *E. coli* cells expressing Sap1p bound to RFB1, as indicated by the retarded complex obtained in the EMSA shown in Fig. 1E (lanes 5 and 6).

Sap1 is a 29-kDa essential DNA-binding protein that binds the SAS1 region at the *S. pombe* mating-type locus (2). Sap1p forms dimers in solution through a long coiled-coil domain at its C terminus (3) and controls the efficiency of mating-type switching (1). An analysis of the SAS1 DNA sequence showed that it is composed of three inverted and imperfect repeats separated by 12 nucleotides (Fig. 2A, arrows). Moreover, characterization of the Sap1p binding sites at SAS1, using DNase I protection experiments, showed two protected DNA sequences that coincide with these repeats (Fig. 2A, underlined sequences) (2). An alignment of RFB1 and SAS1 sequences showed that two of the SAS1 repeats are also present in RFB1 (Fig. 2A), one of them with one mismatch. Using recombinant

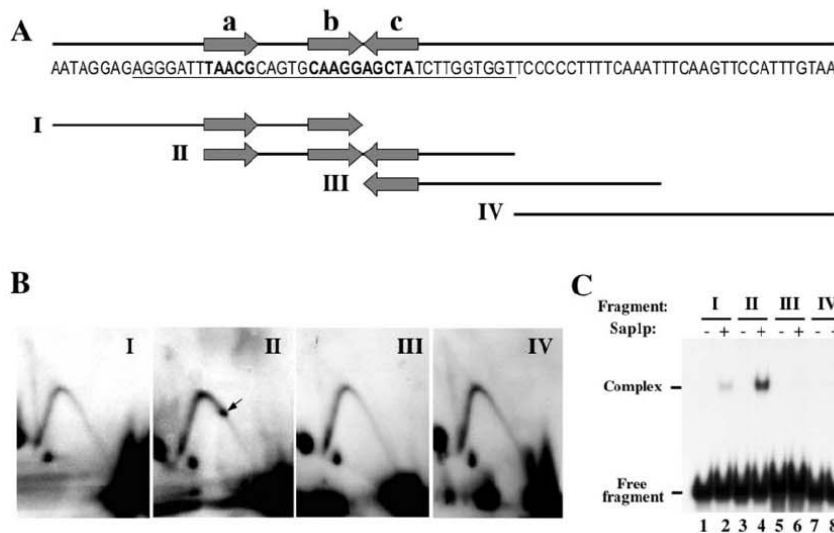


FIG. 3. The three repeats in RFB1 are required together for both replication fork stalling and Sap1p binding. (A) Map of 78-bp RFB1-containing sequence indicating the locations of repeats a, b, and c. Lines I through IV correspond to the overlapping subfragments analyzed in panels B and C. (B) 2D gels of plasmids bearing subfragments I to IV. The arrow points to the accumulated replication intermediates. (C) EMSA with purified Sap1p (0.57  $\mu$ g) and the overlapping subfragments.

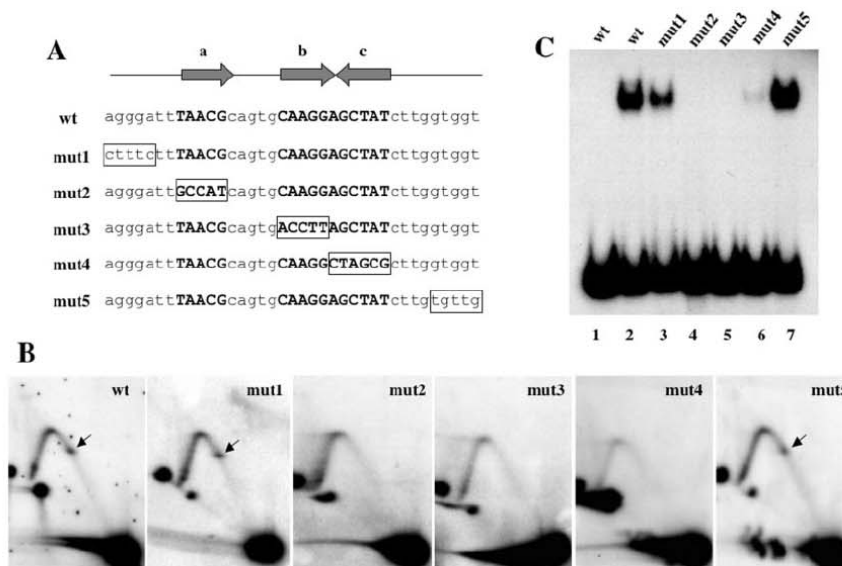


FIG. 4. Sap1p binding to RFB1 repeats is required for replication fork arrest. (A) The sequence underlined in Fig. 3A was used as the wild-type sequence to introduce the indicated mutations (boxes) assayed in panels B and C. (B) Replication intermediates of plasmids bearing wild-type or mutated sequences, analyzed in 2D gels. Arrows point to the accumulated replication intermediates containing arrested forks. (C) EMSA with purified Sap1p (0.57  $\mu$ g) and wild-type or mutated sequences. In lane 1, the binding reaction contained no protein.

Sap1p and randomized double-stranded oligonucleotides, Ghazvini and coworkers (7) proposed a consensus sequence as the most favorable DNA-binding site for Sap1p. This high-affinity binding site is a 5-bp direct repeat separated by five nucleotides, with a thymine being the fourth nucleotide of this spacer in most of the selected oligonucleotides (Fig. 2B). RFB1 fulfils these features, except for one mismatch (Fig. 2B). Taken together, these comparisons show that both RFB1 and SAS1 contain three imperfect repeats, but repeat b is in opposite orientations at these two sites. In addition, repeats a and b in RFB1 are spaced apart by 5 nucleotides, as in the con-

sensus sequence selected by Ghazvini and coworkers (7), whereas they are separated by 12 nucleotides in SAS1. Therefore, the RFB1 and SAS1 sequences are similar, but they show differences that might be relevant to the function of Sap1 at these two loci. Our results are the first evidence of a binding site for the essential protein Sap1 outside the mating-type locus.

**Replication blockage at RFB1 is linked to Sap1p binding.** Sap1p might play a role in RFB1 activity by recognizing the three repeats depicted above. To address this possibility, we tested the capability of four overlapping subfragments covering the entire 78-bp RFB1-containing sequence to bind the purified Sap1p protein and to arrest replication forks in the *in vivo* plasmid replication assay described above (Fig. 3). These subfragments contained repeats a and b (fragment I), a, b, and c (fragment II), c (fragment III), and the 3' end lacking the repeats (fragment IV) (Fig. 3A).

Fragment II, bearing all three repeats, stalled replication forks, as indicated by the spot on top of the simple Y arc (Fig. 3B, arrow). Since fragments I, III, and IV resulted in spotless arcs, we concluded that all three repeats are required for efficient RFB1 activity. Consistently, Sap1p bound with a high affinity only to fragment II (Fig. 3C). This correlation between Sap1p binding and fork stalling strongly suggests that Sap1p is involved in fork blockage at *S. pombe* rRNA genes. Sap1p showed a weak affinity for fragment I (Fig. 3C, lane 2), although it did not give rise to any detectable fork arrest (Fig. 3B, panel I).

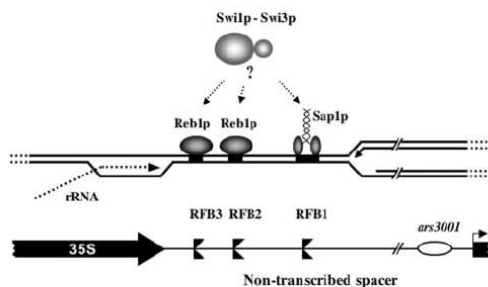


FIG. 5. State of the art of replication fork blockage in *S. pombe* rRNA genes (see the text for details).



To determine the significance of the repeats in RFB1 function, we replaced each repeat with a different sequence such that the least conservative changes were made, i.e., adenines were replaced with cytosines, guanines were replaced with thymines, and vice versa (Fig. 4A, mut2, mut3, and mut4). All of these mutations caused both the loss of RFB1 function and the absence of Sap1p binding (mut2, mut3, and mut4 in Fig. 4B and C). The mutation of repeat c in mut4, however, allowed weak Sap1p binding. This agrees with the result obtained for fragment I, which also lacked repeat c (Fig. 3C, lane 2). Five nucleotides at both sides of the repeat cluster were also mutated, and as expected, they affected neither the barrier activity nor Sap1p binding (mut1 and mut5 in Fig. 4B and C). These results indicate that all of the repeats within the cluster are required for both Sap1p binding and fork arrest and that the surrounding sequences are dispensable.

As mentioned before, Sap1p is essential for cell growth and was originally described as required for efficient mating-type switching. The essential nature of Sap1p, however, is not attributed to its role in switching but is likely due to a more general function in chromosome organization (16). It is also unlikely that the function of Sap1p in arresting replication forks at the rRNA genes makes this protein essential. This is supported by the observation that budding yeast *fob1* mutants lacking functional barriers are viable (14). However, our findings raise the possibility that Sap1p could play an essential role in the organization of rRNA gene repeats and the nucleolar architecture.

Interestingly, in contrast to our results with the rRNA genes, the binding of Sap1p to the *mat1* locus does not act as a replication fork obstacle (6). We believe that this could rely on the different disposition of the recognition sequences in RFB1 compared to that of sequences in SAS1 (Fig. 2), which may determine different binding modes of Sap1p dimers.

As shown in Fig. 1C (panels e-*swi1* and e-*swi3*), replication fork arrest induced by the 78-bp sequence of RFB1 was abolished in the *swi1Δ* and *swi3Δ* mutant strains, indicating that these two proteins, which operate together as a heterodimer (23), are required for RFB1 function. This is in agreement with the recent finding that the accumulation of forks at all three RFBs depends on the presence of Swi1 and Swi3, although neither of these two proteins directly associates with the DNA at the barriers (15, 17). Here we identified Sap1p as the cognate RFB1 binding protein, which in turn may serve as a platform for the formation of a more sophisticated complex. The Swi1-Swi3 heterodimer may be part of this complex, even though it does not physically interact with Sap1p (17). Alternatively, the Swi1-Swi3 complex may not be involved in the arrest of replication forks. Instead, it could stabilize the stalled forks, as proposed for those accidentally arrested (23), so that these forks are not processed and remain Y-shaped structures long enough to be detected in 2D gels. This is supported by the observation that the simple Y replication intermediates that accumulate at the two natural pausing sites flanking the *mat1* locus are not detected in *swi1* and *swi3* mutants (6).

**Concluding remarks.** In summary, the factors currently known to be involved in *S. pombe* rRNA gene barriers are shown in Fig. 5. Two cognate DNA-binding proteins recognize the three barriers present in the rRNA gene nontranscribed spacer. The transcription termination factor Reb1p binds to

two specific 17-bp sequences and blocks the replication fork moving countertranscriptionally that originated at *ars3001* (26). These two fork arrest sites correspond to barriers RFB2 and RFB3. RFB1 functions upon binding of a Sap1p dimer. This barrier is the strongest and the first that the replication fork encounters. Our data demonstrated that these three barriers are independent of each other. RFB2 and RFB3 sequences are fully functional in the absence of the sequence required for RFB1 and vice versa. Moreover, RFB1 is fully active in *reb1Δ* mutant cells (26). Therefore, it is unlikely that an interaction between Reb1p and Sap1p is needed for fork arrest at any of the barriers. Finally, the switching proteins Swi1 and Swi3 are required for all three barriers, although as discussed above, the molecular basis for this requirement remains unknown.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by grants BFU2004-00125, SAF2001-1740, and BMC2002-00546 and a fellowship to E.M.-R. from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia and by a fellowship from the Comunidad de Madrid-Fondo Social Europeo to A.S.-G.

We are grateful to R. Giraldo for technical advice and R. Torres, R. Rodríguez, and L. Rodríguez for stimulating discussions and help throughout the course of this study.

#### REFERENCES

- Arcangioli, B., T. Copeland, and A. Klar. 1994. Sap1, a protein that binds to sequences required for mating-type switching, is essential for viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* 14:2058–2065.
- Arcangioli, B., and A. J. S. Klar. 1991. A novel switch-activating site (SAS1) and its cognate binding factor (SAP1) required for efficient *mat1* switching in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* 10:3025–3032.
- Bada, M., D. Walthers, B. Arcangioli, S. Doniach, and M. Delarue. 2000. Solution structural studies and low-resolution model of the *Schizosaccharomyces pombe* sap1 protein. *J. Mol. Biol.* 300:563–574.
- Benguria, A., P. Hernández, D. B. Krimer, and J. B. Schwartzman. 2003. Sir2p suppresses recombination of replication forks stalled at the replication fork barrier of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 31:893–898.
- Brewer, B. J., and W. L. Fangman. 1988. A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes. *Cell* 55:637–643.
- Dalgaard, J. Z., and A. J. S. Klar. 2000. swi1 and swi3 perform imprinting, pausing, and termination of DNA replication in *S. pombe*. *Cell* 102:745–751.
- Ghazvini, M., V. Ribes, and B. Arcangioli. 1995. The essential DNA-binding protein Sap1 of *Schizosaccharomyces pombe* contains two independent oligomerization interfaces that dictate the relative orientation of the DNA-binding domain. *Mol. Cell. Biol.* 15:4939–4946.
- Giraldo, R., J. M. Andreu, and R. Diaz-Orejas. 1998. Protein domains and conformational changes in the activation of RepA, a DNA replication initiator. *EMBO J.* 17:4511–4526.
- Hernández, P., L. Martín-Parras, M. L. Martínez-Robles, and J. B. Schwartzman. 1993. Conserved features in the mode of replication of eukaryotic ribosomal RNA genes. *EMBO J.* 12:1475–1485.
- Hindley, J., G. Phear, M. Stein, and D. Beach. 1987. *suc11* encodes a predicted 13-kilodalton protein that is essential for cell viability and is directly involved in the division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* 7:504–511.
- Kaerberlein, M., M. McVey, and L. Guarente. 1999. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* 13:2570–2580.
- Kobayashi, T. 2003. The replication fork barrier site forms a unique structure with Fob1p and inhibits the replication fork. *Mol. Cell. Biol.* 23:9178–9188.
- Kobayashi, T., D. J. Heck, M. Nomura, and T. Horiuchi. 1998. Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I. *Genes Dev.* 12:3821–3830.
- Kobayashi, T., and T. Horiuchi. 1996. A yeast gene product, Fob1 protein, required for both replication fork blocking and recombinational hotspot activities. *Genes Cells* 1:465–474.
- Krings, G., and D. Bastia. 2004. swi1- and swi3-dependent and independent replication fork arrest at the ribosomal DNA of *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:14085–14090.

16. Lahondès, R., V. Ribes, and B. Arcangeli. 2003. Fission yeast Sap1 protein is essential for chromosome stability. *Eukaryot. Cell* 2:910–921.
17. Lee, B. S., S. I. Grewal, and A. J. Klar. 2004. Biochemical interactions between proteins and *mat1 cis*-acting sequences required for imprinting in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.* 24:9813–9822.
18. Linskens, M. H. K., and J. A. Huberman. 1988. Organization of replication of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8:4927–4935.
19. Little, R. D., T. H. K. Platt, and C. L. Schildkraut. 1993. Initiation and termination of DNA replication in human rRNA genes. *Mol. Cell. Biol.* 13:6600–6613.
20. López-Estraño, C., J. B. Schwartzman, D. B. Krimer, and P. Hernández. 1998. Co-localization of polar replication fork barriers and rRNA transcription terminators in mouse rDNA. *J. Mol. Biol.* 277:249–256.
21. Mohanty, B. K., and D. Bastia. 2004. Binding of the replication terminator protein Fob1p to the Ter sites of yeast causes polar fork arrest. *J. Biol. Chem.* 279:1932–1941.
22. Moreno, S., A. Klar, and P. Nurse. 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* 194:795–823.
23. Noguchi, E., C. Noguchi, W. H. McDonald, J. R. Yates, and P. Russell. 2004. Swi1 and Swi3 are components of a replication fork protection complex in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.* 24:8342–8355.
24. Olavarrieta, L., P. Hernández, D. B. Krimer, and J. B. Schwartzman. 2002. DNA knotting caused by head-on collision of transcription and replication. *J. Mol. Biol.* 322:1–6.
25. Prentice, H. L. 1992. High efficiency transformation of *Schizosaccharomyces pombe* by electroporation. *Nucleic Acids Res.* 20:621.
26. Sánchez-Gorostiaga, A., C. López-Estraño, D. B. Krimer, J. B. Schwartzman, and P. Hernández. 2004. Transcription termination factor Reb1p causes two replication fork barriers at its cognate sites in fission yeast ribosomal DNA in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 24:398–406.
27. Takeuchi, Y., T. Horiuchi, and T. Kobayashi. 2003. Transcription-dependent recombination and the role of fork collision in yeast rDNA. *Genes Dev.* 17:1497–1506.
28. Wiesendanger, B., R. Lucchini, T. Koller, and J. M. Sogo. 1994. Replication fork barriers in the *Xenopus* rDNA. *Nucleic Acids Res.* 22:5038–5046.
29. Zhang, Z., D. M. Macalpine, and G. M. Kapler. 1997. Developmental regulation of DNA replication: replication fork barriers and programmed gene amplification in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell. Biol.* 17:6147–6156.